



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی شهید بابایی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی

عنوان پایان نامه

بررسی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی زنیان، افسنطین، چای

کوهی، غوزه پنبه و بومادران در *Invitro*

استاد راهنما

دکتر مهرزاد سرائی صحنه سرائی

اساتید مشاور

دکتر عباس آزاد مهر

دکتر حسن جهانی هاشمی

نگارش: شقایق نوزری

سال تحصیلی: ۹۴-۹۳

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

چکیده فارسی

مقدمه: تولید داروهای ضد توکسوپلازما با اثر بخشی بالا و عوارض جانبی کم از اهداف مهم تحقیقاتی توکسوپلازماست. یکی از گزینه ها برای این منظور، فراورده های گیاهی است.

هدف: این مطالعه به منظور تعیین اثر کشندگی عصاره های اتانولی گیاهان افسنطین، چای کوهی، بومادران، زنیان و غوزه پنبه بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما در شرایط برون تنی عاری از سلول و در کشت سلولی انجام شد.

روش کار: در تجربه نخست، تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلازما گوندی ای با غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم/ میلی لیتر عصاره های افسنطین، زنیان، غوزه پنبه، چای کوهی و بومادران در مدت زمان های ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه به طور جداگانه مجاورت و سپس با بلودومتیلن قلیایی رنگ آمیزی شدند. نتایج به صورت میزان (درصد) مورتالیتی تاکی زوئیت ها (تاکی زوئیت های رنگ نشده) بیان شد. از روش زیست سنجی در موش برای تایید ۱۰۰٪ مورتالیتی تاکی زوئیت ها استفاده شد. در تجربه دوم، تاکی زوئیت ها با غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر عصاره های افسنطین، چای کوهی و بومادران در کشت سلولی هلا مجاورت داده شد. داروی پریمتامین نیز به عنوان کنترل استفاده شد. اثر سایتوتوکسیسیته عصاره ها و پریمتامین با روش MTT تعیین شد و مقادیر EC50 و Selectivity آنها محاسبه شد. تمامی آزمایشات به صورت سه گانه انجام شد. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون های آماری ANOVA و Post Hoc Tests آنالیز گردید. مقادیر EC50 با استفاده از نرم افزار Prism محاسبه شد.

یافته ها : به طور کلی در تجربه اول (شرایط برون تنی عاری از سلول)، ۱۰۰٪ تاکی زوئیت ها در غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم/ میلی لیتر عصاره افسنطین، چای کوهی و بومادران در مدت زمان های انکوباسیون ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه کشته شدند. در غلظت ۵۰ میلی گرم/ میلی لیتر عصاره های افسنطین و چای کوهی نیز ۱۰۰٪ اثر کشندگی داشتند. درصد کشندگی زنیان در بالاترین حد ۱۰۰٪ و در کمترین حد $4/65 \pm 2/1$ ٪ بود. بالاترین حد کشندگی غوزه پنبه $13/30 \pm 7/15$ ٪ بود. به روش زیست سنجی در موش، ۱۰۰٪ مورتالیتی تاکی زوئیت ها تایید شد. در محیط کشت سلولی، EC50 و Selectivity به ترتیب برای عصاره افسنطین، ۱۵۹ و ۰/۷۵؛ عصاره چای کوهی ۱۵۳ و ۰/۶۹ و بومادران، ۲۱۵ و ۰/۷۳ بود. همچنین این مقادیر برای داروی پریمتامین، ۰/۱۷۶ و ۳/۴۰ بود.

نتیجه گیری: هر پنج عصاره اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها داشتند. این اثر برای افسنطین و بومادران و چای کوهی به طور معنی دار بیشتر از زنیان و غوزه پنبه بود.

کلید واژه: توکسوپلازما گوندی ای، عصاره گیاهی، چای کوهی، بومادران، زنیان، افسنطین،

غوزه پنبه، برون تنی

فصل اول: مقدمه

۲	اهمیت توکسوپلازما و توکسوپلاسموز
۴	تاریخچه شناسایی توکسوپلازما گوندی ای
۴	پیشرفتهای عمده در تحقیقات توکسوپلازما
۶	تاکسونومی توکسوپلازما گوندی ای
۷	مورفولوژی و بیولوژی اشکال عفونی زای توکسوپلازما
۱۱	چرخه زندگی توکسوپلازما
۱۳	راههای انتقال توکسوپلازما گوندی ای
۱۴	انتشار جغرافیایی و شیوع توکسوپلازما در نقاط مختلف کره زمین
۱۴	انتشار جغرافیایی و شیوع توکسوپلازما در نقاط مختلف ایران
۱۵	بیماریزایی و علائم بالینی توکسوپلاسموز
۱۷	تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز
۲۱	درمان توکسوپلاسموز
۲۲	کنترل و پیشگیری توکسوپلاسموز

۲۲	مروری بر تاریخچه استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی
۲۲	مروری بر انواع گیاهان دارویی مورد استفاده برای درمان عفونت ها در طب سنتی
	مروری بر گرایش های تحقیقاتی در زمینه گیاهان دارویی و تجاری سازی فرآورده های گیاهی در دهه های
۲۴	اخیر
۲۵	مروری بر گیاهان مورد مطالعه، خواص درمانی و ترکیبات تشکیل دهنده
۲۶	گیاه افسنطین
۲۷	گیاه بومادران
۲۹	گیاه غوزه پنبه
۳۱	گیاه چای کوهی
۳۳	گیاه زنیان
۳۵	مروری بر تست MTT، اساس تست و کاربرد آن
	فصل دوم: بیان مسئله، اهداف، فرضیات و مرورمتون
۳۸	بیان مسئله
۳۹	اهداف و فرضیات
۳۹	اهداف کاربردی
۳۹	فرضیه ها (Hypothesis) یا سوال های پژوهش
۴۰	مرور متون
۴۱	مطالعات انجام شده در سایر کشورها
۴۲	مطالعات انجام شده در مورد اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها و فراکشن های گیاهی

فصل سوم: مواد و روش ها

۴۷	تهیه گیاهان مورد مطالعه و شناسایی آنها
۴۸	عصاره گیری
۴۸	تهیه و نگهداری سویه توکسوپلازما گوندی ای
۴۸	ارزیابی اثرات ضد توکسوپلازمایی عصاره های گیاهی
۴۹	اثرات ضد توکسوپلازمایی عصاره های گیاهی در شرایط برون تنی عاری از سلول
۴۹	تهیه و آماده سازی عصاره های گیاهی
۴۹	تهیه غلظت های مختلف از عصاره ها
۴۹	تکثیر و آماده سازی تاکي زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای
۵۰	تهیه و آماده سازی رنگ متلین بلو قلیایی
۵۱	مجاورت عصاره های گیاهی با تاکي زوئیت ها و تعیین درصد مورتالیتی
۵۲	زیست سنجی تاکي زوئیت های مجاورت داده شده با عصاره ها در موش
۵۲	اثرات ضد توکسوپلازمایی عصاره های گیاهی در کشت سلولی
۵۲	دودمان سلولی مورد استفاده، تهیه، تکثیر و نگهداری آن
۵۳	محلول های مورد نیاز
۵۳	بافر فسفات سالین (PBS)
۵۴	تهیه و آماده سازی محلول رنگ آمیزی تریپان بلو
۵۵	تهیه محیط مغزی برای کشت سلول

۵۶	شمارش سلول های هلا و تعیین ویابلیتی سلول ها
۵۶	فرمول شمارش سلول ها HeLa
۵۶	فرمول محاسبه Viability
۵۶	آماده سازی تاکي زوئیت ها
۵۶	آماده سازی عصاره ها برای مجاورت با تاکي زوئیت ها در کشت سلولی
۵۷	تهیه و آماده سازی داروی پریمتامین
۵۷	مجاورت عصاره های گیاهی و داروی پریمتامین با تاکي زوئیت ها
۵۸	چارت مجاورت تاکي زوئیت ها با غلظت های مختلف عصاره ها و دارو در کشت سلول
۶۱	سنجش اثر سایتوتوکسیسیته با روش MTT
	فصل چهارم: نتایج
۶۴	اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در شرایط برون تنی عاری از سلول
۶۴	میزان مورتالیتی تاکي زوئیت های مجاورت یافته با عصاره افسنطین
۶۵	مورتالیتی تاکي زوئیت های مجاورت یافته با عصاره زنبان
۶۷	میزان مورتالیتی تاکي زوئیت های مجاورت یافته با عصاره غوزه پنبه
۶۹	میزان مورتالیتی تاکي زوئیت های مجاورت یافته با عصاره چای کوهی
۷۰	میزان مورتالیتی تاکي زوئیت های مجاورت یافته با عصاره بومادران
۷۲	نتایج زیست سنجی در موش
۷۲	اثر مهاري عصاره های گیاهی بر تاکي زوئیت های توکسوپلازما در کشت سلولی

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۷۶	بحث
۸۲	نتیجه گیری
۸۲	پیشنهادهات
۸۳	منابع
۹۴	خلاصه انگلیسی

فهرست جداول

جدول ۱. میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازماگوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه افسنطین	۶۴
جدول ۲. میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازماگوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه زنیان	۶۵
جدول ۳. میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه غوزه پنبه	۶۷
جدول ۴. میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه چای کوهی	۶۹
جدول ۵. میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه بومادران	۷۰
جدول ۶. نتایج آزمون تعقیبی توکی در مقایسه چند گانه	۷۱

جدول ۷. اثرمهارى عصاره هاى اتانولى گياهان افسنطين، بومادران وچايكوه برتاكى زوئيت هاى توكسوپلازما

۷۲

گوندی ای درکشت سلولی HeLa

فهرست اشكال

شكل ۱. درصد مورتاليتى تاكى زوئيت ها درغلظت هاى ۱۰، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ ميلي گرم /ميلي ليترعصاره

۶۵

افسنطين درمدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقيقه انكوباسيون دردمای آزمایشگاه

شكل ۲. درصد مورتاليتى تاكى زوئيت ها درغلظت هاى ۱۰، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ ميلي گرم /ميلي ليترعصاره زنيان

۶۶

درمدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقيقه انكوباسيون دردمای آزمایشگاه.

شكل ۳. درصد مورتاليتى تاكى زوئيت ها در غلظت هاى ۱۰، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ ميلي گرم /ميلي ليترعصاره غوزه

۶۸

پنبه در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقيقه انكوباسيون دردمای آزمایشگاه

شكل ۴. درصد مورتاليتى تاكى زوئيت ها درغلظت هاى ۱۰، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ ميلي گرم /ميلي ليترعصاره چای

۷۰

كوهى درمدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقيقه انكوباسيون دردمای آزمایشگاه

شكل ۵. درصد مورتاليتى تاكى زوئيت ها درغلظت هاى ۱۰، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ ميلي گرم /ميلي ليترعصاره

۷۱

بومادران درمدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقيقه انكوباسيون دردمای آزمایشگاه

شكل ۶. مقايسه درصد ويا بيليتى غلظت هاى مختلف عصاره هاى افسنطين و داروى پيريمتامين درسلول هاى

۷۳

هلاى آلوده به تاكى زوئيت توكسوپلازما درمقايسه با كنترل

شكل ۷. مقايسه درصد ويا بيليتى غلظت هاى مختلف عصاره هاى بومادران و داروى پيريمتامين در سلول هاى

۷۴

هلاى آلوده به تاكى زوئيت توكسوپلازما در مقايسه با كنترل

شكل ۸. مقايسه درصد ويا بيليتى غلظت هاى مختلف عصاره چای كوهى و داروى پيريمتامين در سلول هاى

۷۵

هلاى آلوده به تاكى زوئيت توكسوپلازما در مقايسه با كنترل.

کلمات اختصاری

PBS	Phosphate buffer saline
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide
OD	optical density
HFF	human foreskin fibroblast
DMSO	Dimethyl sulfoxide
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
PCR	Polymerase Chain Reaction
TD 50	Toxic dose
ID50	inhibitory dose
LD50	Lethal dose
EC50	Effective Concentration
Hela	Henrietta Lacks
Pen strep	Penicillin streptomycin

فصل اول

مقدمه

اهمیت توکسوپلازما و توکسوپلاسموز

توکسوپلازما گوندی ای (*Toxoplasma gondii*) عامل توکسوپلاسموز در انسان و حیوانات است، از شایع ترین زئونوزهای انگلی است، انتشار گسترده جهانی دارد، هم در انسان ها و هم در حیوانات بسیار شایع است، نه تنها در کشورهای در حال توسعه انگل بسیار شایعی است، بلکه در کشورهای توسعه یافته صنعتی نیز شایع ترین انگل بیماریزای انسان است. با وجودی که امروزه بسیاری از عفونت های انگلی به واسطه ارتقاء سطح بهداشت و توسعه امکانات بهداشتی درمانی و اجرای برنامه های کنترل و پیشگیری به طور چشمگیری کاسته شده است، ولی توکسوپلازما همچنان از شیوع بالایی برخوردار بوده و اهمیت پزشکی روزافزونی دارد(۱).

تا پیش از شایع شدن سندرم نقص سیستم ایمنی (*Acquired Immune Deficiency Syndrom*) یا ایدز، اهمیت عمده توکسوپلاسموز به موارد مادرزادی آن مربوط می شد که به سبب ضایعات شدید مغزی و چشمی، اثرات ماندگاری بر جا می گذارد. با جهانگیر شدن ایدز در اوایل دهه ۸۰ میلادی، توکسوپلازما یک فرصت طلب مهم در این بیماران شناخته شد که در این افراد انگل های نهفته در کیست های بافتی مجدداً فعال شده و ضایعات مغزی وسیعی ایجاد می کند که تهدید کننده حیات است. به طوری که این انگل به عنوان مهمترین عامل ایجاد کننده آنسفالیت در بیماران ایدزی شناخته شده است. همچنین، با افزایش رو به رشد استفاده از داروهای ایمنوساپرسیو و سیتوتوکسیک در موارد پیوند اعضا، ابتلا به بدخیمی

ها و سایر اختلالات ایمنی، توکسوپلازما به عنوان یک تهدید کننده حیات در این موارد نیز اهمیت روزافزونی پیدا کرد.

در سال های اخیر توکسوپلازموز از جهت دیگری نیز مورد توجه قرار گرفته است که به ماهیت عفونت های مزمن (نهفته) طولانی مدت آن در مغز مربوط می شود. به طوری که این انگل به عنوان یک اتیولوژی احتمالی برخی از بیماری ها و نشانه های مغزی که اتیولوژی آنها کاملاً شناخته نشده است، مورد توجه قرار گرفته است. بیشترین شواهد مربوط به اسکیزوفرنی است. همچنین، این انگل به عنوان یک عامل سببی احتمالی اختلالات دو قطبی، اپی لپسی کریپتوزیک، میگرن، تغییرات شخصیتی و رفتاری مورد توجه محققین توکسوپلازما قرار گرفته است.

از طرف دیگر، توکسوپلازما در دامپزشکی نیز از اهمیت خاصی برخوردار است و یک عامل مهم سقط در دام ها به ویژه گوسفند، بز و خوک شناخته شده است.

توکسوپلازما انگل پیچیده ای است و ناشناخته های فراوانی دارد. علیرغم آنکه بعد از حدود ۶۰ سال از توصیف اولیه این انگل، چرخه زندگی آن در طبیعت شناخته شد، ولی هنوز نکات ناشناخته ای در چرخه زندگی توکسوپلازما وجود دارد.

تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلازموز نیز از پرچالش ترین موارد تشخیص آزمایشگاهی بیماری های انگلی است. به طوری که همواره بخش عمده ای از تحقیقات توکسوپلازما را به خود اختصاص داده است.

درمان توکسوپلاسموز با محدودیت هایی همراه است. داروهای سنتتیک ضد توکسوپلازما دارای اثرات جانبی قابل توجهی اند و فقط بر تاکی زوئیت ها موثرند و ریشه کن کننده عفونت نیستند.

تاریخچه شناسایی توکسوپلازما گوندی ای

توکسوپلازما گوندی اولین بار) در سال ۱۹۰۸ توسط نیکول و مانسوی (Nicolle & Manceaux) شناسایی شد. نام این تک یاخته اشاره به هلالی یا کمانی بودن تک یاخته (در زبان یونانی Toxon به معنای کمان است) و میزبان اولیه ی انگل کتینو داکتیلوس گوندی (Ctendactylus gondii) است که چونده ای صحرایی کوچک در شمال آفریقا است که با موش صحرایی قرابت دارد. در سال ۱۹۲۳ ژانکو (Jancoue) چشم پزشک مقیم پراگ مقاطع کیست و تروفوزوئیت های این انگل را در برش بافتی نوزاد با توکسوپلاسموز مادرزادی گزارش کرد. در سال ۱۹۳۹ سابین (Sabin) و پینکرتون (Pinkerton) آلودگی اکتسابی به توکسوپلازما را در بچه ها و بزرگسالان گزارش نمودند. پیشرفت در آزمایشات سرولوژی توسط سابین و فلدمن (Feldman) در سال ۱۹۴۸ منجر به شناخت بیشتری از آلودگی های این تک یاخته شد که نهایتاً تست رنگی (Dye Test) را جهت تشخیص این بیماری ارائه دادند (۱).

پیشرفت های عمده در تحقیقات توکسوپلازما: تحقیقات گسترده ای در زمینه های مختلف توکسوپلازما به ویژه در سه دهه اخیر انجام شده است که مهمترین آنها توسط Boothroyd

در سال ۲۰۰۹ گردآوری شده است که شامل ۲۵ پیشرفت عمده در ۲۵ سال اخیر می باشد.

مطالب زیر برگرفته شده از این مقاله می باشد (۲):

[۱] شناسایی ژنوتایپ های توکسوپلازما: با استفاده از روش مولکولی مشخص شد که

توکسوپلازما دارای ۳ ژنوتایپ (کلون) اصلی I، II و III می باشد و در سویه های جدا شده

از انسان و حیوانات خانگی / مزرعه تفاوت بسیار کمی مشاهده شده است.

[۲] تفاوت آنتی ژنی و بیوشیمیایی مراحل مختلف تکاملی توکسوپلازما (تاکی زوئیت ها و

برادی زوئیت ها).

[۳] تبدیل تاکی زوئیت ها به برادی زوئیت ها تحت شرایط استرس در *in vitro*.

[۴] دستکاری ژنوم توکسوپلازما در شرایط *in vitro*.

[۵] شناسایی ژنوم توکسوپلازما: شامل ۱۴ کروموزوم و 65-70 Mbp.

[۶] آمیزش های آزمایشگاهی برای ترسیم فنوتایپ ها و ژنهای مهم.

[۷] شناسایی Apicoplast به عنوان یک پلاستید.

[۸] شناسایی نقش میکرونم ها از نظر ترشح مواد چسبنده مهمی که در حرکت سر خوردن و

تهاجم سلولی نقش دارند.

[۹] مشارکت پروتئین های راپتری و میکرونم در اتصال سلولی در طی تهاجم.

[۱۰] شناسایی آنتی ژن های اختصاصی مرحله ای: آنتی ژن های متصل به

(GPI) inositolglycophosphatidyl در مراحل مختلف تکاملی.

[۱۱] آزاد شدن پروتئین هایی از دنس گرانول ها و راپتری ها از طریق غشا به داخل سلول.

- [۱۲] ورود پروتئین های محلول به طور مستقیم به داخل سلول.
- [۱۳] پلی مرفیسم پروتئین های مترشحه از راپتری.
- [۱۴] شناسایی برخی مسیر های بیوشیایی در توکسوپلازما که بسیار شبیه گیاهان بوده و در حیوانات وجود ندارد.
- [۱۵] شناسایی مسیرهای چندگانه برای تحریک ذاتی پاسخ ایمنی.
- [۱۶] شناسایی القا IL-12 و تولید INF گاما به عنوان مدیاتور اصلی در پاسخ ایمنی علیه توکسوپلازما می باشد.
- [۱۷] تعداد کمی از آنتی ژن های توکسوپلازما هدف پاسخ ایمنی قرار می گیرند.
- [۱۸] نقش MHC به عنوان یک شاخص و متغیر مهم در بروز توکسوپلاسموز.
- [۱۹] شناسایی اختلال مسیر اپوپتیک در سلول های آلوده به انگل .
- [۲۰] تمایز آنسفالیت توکسوپلاسمایی در بیماران ایدزی از سایر بیماری ها با استفاده از تکنیک های تصویربرداری غیرتهاجمی.
- [۲۱] PCR به عنوان یک روش حساس در تشخیص توکسوپلازما.
- [۲۲] پیشرفت هایی در تمایز سرولوژیک عفونت های حاد از مزمن.
- [۲۳] شناسایی عملکرد ارگانل به عنوان منبع مهم اهداف داروهای جدید.
- [۲۴] استفاده از انگل تضعیف شده به عنوان یک کاندید مناسب برای تولید واکسن
- [۲۵] توکسوپلازما و تاثیر آن بر رفتار میزبان.
- تاکسونومی توکسوپلازما گوندی ای

طبقه بندی توکسوپلازما گوندی ای بر اساس کتاب Gerald D. Schmidt & Larry S.

Roberts' foundations of parasitology به شرح زیر است (۳):

Serup-group: Chromalveolata

Superphylum: Alveolata

Phylum: Apicomplexa

Class: Conoidasida

Subclass: Coccidiasina

Order: Eucoccidiorida

Suborder: Eimeriorina

Family: Sarcocystidae

Subfamily: Toxoplasmatinae

Genus: Toxoplasma

Species: gondii

مورفولوژی و بیولوژی اشکال عفونی زای توکسوپلازما

اشکال مختلف این تک یاخته شامل موارد زیر است:

الف) اشکالی که در سلولهای بافتهای خارج روده ای میزبان واسط و نهایی دیده می شوند

شامل:

۱. تاکی زوئیت (Tachyzoite)

۲. کیست کاذب (Pseudocyst)

۳. کیست نسجی (Tissue Cyst)

ب) اشکالی که در اپیتلیوم روده و مدفوع میزبان نهایی دیده می شوند :

۱. تروفوزوئیت (Trophozoite)

۲. گامتوسیت (Gametocyte)

۳. زیگوت (Zygote)

۴. اووسیست (Oocyst) (۴).

۱. تاکی زوئیت (*Tachyzoite*): تاکی زوئیت توسط فرانکل نامگذاری شد. تاکوس در زبان یونانی به معنی سریع و سرعت است. این فرم انگل هلالی شکل است و اندازه آن حدود 6×2 میکرون می باشد. یک انتهای آن باریک ترو انتهای دیگر آن پهن تر است. دارای هسته بزرگی است که در قسمت وسط یا نیمه تحتانی تاکی زوئیت قرار دارد. تاکی زوئیت ها فرم انتشاری توکسوپلازما در بدن و مسئول تخریب سلول ها و بافت ها در مرحله حاد عفونت هستند. آنها به طریق اندودیوزنی تقسیم می شوند (۴).

۲. کیست کاذب: به مجموعه سلول هسته دار میزبان مانند ماکروفاژ یا منوسیت که حاوی تاکی زوئیت های توکسوپلازما باشند کیست کاذب گفته می شود . با توجه به اینکه ماهیت غشا اطراف کیست متعلق به سلول بوده و انگل نقشی در آن ندارد، لذا این نام نهاده شده است. تعداد تاکی زوئیت های داخل آن ۲۰ تا ۴۰ عدد است و در دوره حاد بیماری تشکیل می شود و اجزای داخلی آن از نظر رنگ آمیزی PAS (Periodic Acid Schiff) منفی هستند (۴).

۳. کیست نسجی : مرحله ساکن یا بی حرکت انگل در بدن میزبان است. در بافت های مختلف خصوصا در مغز، عضلات، قلب و چشم تشکیل می شود. در بافت های نرم معمولا کیستهای نسجی توکسوپلازما کروی و معمولا بین ۵۰ تا ۷۰ میکرون هستند. گاهی از ۱۰۰ میکرون هم بزرگتر می شوند. این کیست ها با شکل سلول میزبان سازگارند و در سلول های

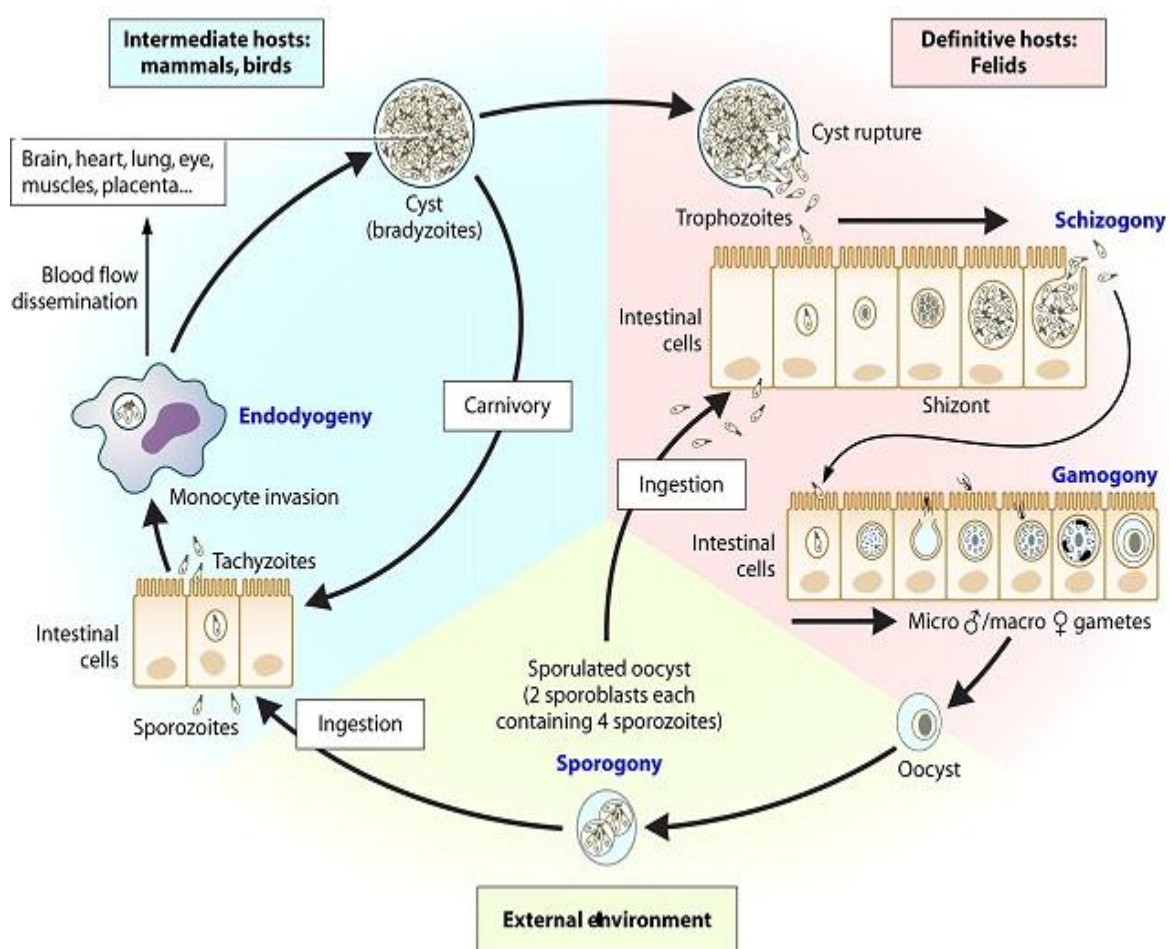
عضلانی کشیده اند. این شکل از انگل حاوی اشکالی بنام برادی زوئیت است که حداقل فعالیت متابولیک را دارد. برادی زوئیت از نظر شکل ظاهری کاملاً شبیه تاکی زوئیت است که به طریق اندودیوزنی تقسیم و تکثیر می شود ولی تکثیر آن به سرعت تاکی زوئیت نیست. برادی در زبان یونانی به معنی کند و آرام است. دیواره ی آنها نقره دوست بوده و PAS مثبت می باشند. تعداد برادی زوئیت ها در کیست های بزرگ بالغ بر چند هزار برآورد شده است. کیست های نسجی در دمای ۴ درجه ی سانتیگراد به مدت ۶۸ روز عفونت زا باقی می ماند و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد از بین می روند. کیست ها در دمای ۴ تا ۶ درجه سانتی گراد بیش از ۲ ماه حفظ می شوند ولی به دمای ۷۰ درجه سانتی گراد مقاوم نیستند (۴).

۴. اووسیست (Oocyst): این مرحله از انگل فقط در میزبان نهایی (گربه سانان) تشکیل می شود. اووسیست های کروی یا نیمه کروی در سلول های اپی تلیال روده تشکیل و به داخل حفره روده می ریزند و به هنگام دفع با مدفوع گربه به صورت نارس خارج می شوند. اووسیست در این مرحله ۱۰-۱۳ میکرون قطر و ۹-۱۱ میکرون عرض دارد. دیواره اووسیست دو جداره بوده و محتوی مواد غیر قابل تفکیکی است ولی این مواد چند روز پس از دفع اووسیست تبدیل به ۲ اسپوروسیست می شوند که در هر کدام ۴ اسپورزوئیت تشکیل می شود.

گربه بعد از خوردن گوشت حاوی کیست نسجی پس از گذشت ۱۰-۳ روز روزانه حدود ۱۰ میلیون اووسیست به مدت بیش از ۲۰ روز دفع می کند و اگر آلودگی گربه با اووسیست

باشد، دوره نهفتگی طولانی تر است و حدود ۱۸ تا ۴۹ روز بعد گربه شروع به دفع اووسیست

می کند (۴).



چرخه زندگی توکسوپلازما

با اینکه توکسوپلازما مثل بسیاری از کوکسیدی‌های دیگر قادر است سیر تکاملی خود را در یک میزبان کامل نماید، اما از آنجایی که اکثر پستانداران و پرندگان دیگر میزبان مناسبی برای این انگل هستند، معمولاً سیر تکاملی آن در دو میزبان یکی میزبان نهایی یعنی گربه و گربه سانان (خانواده Felidae) و دیگری میزبان واسطه یا اتفاقی مانند اکثر مهره داران خونگرم انجام می‌گیرد. در سیر تکاملی این انگل دو مرحله روده ای و خارج روده ای وجود دارد (۲).

(۱) مرحله جنسی یا روده ای یا ایزوسپوریک (Isosporic Phase) و اسپورولاسیون محیطی:

این مرحله در اپیتلیوم روده ی باریک میزبان نهایی و با خوردن اوووسیست و نسج آلوده (کیست نسجی) انجام می‌شود. در این مرحله انگل به دو طریق یکی به روش غیرجنسی شیزوگونی و دیگری به روش جنسی سینگامی در سلولهای اپیتلیال روده تکثیر می‌یابد. بعد از بلع اوووسیست یا کیست نسجی در روده گربه اسپروزوئیت‌ها/ برادی‌زوئیت‌ها آزاد شده و به نسج روده حمله می‌کنند و در سلولهای اپیتلیال روده تکثیر شیزوگونی انجام داده و منجر به ایجاد شیزونت (Schizont) یا مرون (Meront) می‌شوند. سپس شیزونت‌ها پاره شده و مروزوئیت‌ها به سلولهای دیگر حمله می‌کنند. در ادامه تکثیر شیزوگونی برخی از مروزوئیت‌ها پس از ورود به داخل سلول‌های اپی‌تلیال تکامل جنسی را شروع می‌کنند. برخی به میکروگامتوسیت (Microgametocyte) و برخی ماکروگامتوسیت (Macrogametocyte) تبدیل می‌شوند. متعاقباً گامتوسیت‌ها به سلول‌های جنسی (گامتوسیت‌ها) تبدیل می‌شوند. گامتوسیت‌ها به ۱۲ گامت‌ها و گامتوسیت ماده به یک گامت

تکامل می یابد. گامت نر دارای تاژک بوده و به طرف گامت ماده حرکت می کند و پدیده سینگامی (Syngamy) انجام شده و سلول تخم (Zygote) حاصل می شود. سلول تخم در سلول اپی تلیال روده پوشش دار شده و لایه ای محکم به دور خود ترشح می کند و به صورت اووسیست نارس همراه مدفوع دفع می شود. اووسیست در محیط مساعد بیرون طی ۵-۱ روز اسپورولاسیون (Sporulation) انجام داده و به اووسیست رسیده که عفونت زا است تبدیل می شود. مجموعه گامتوگونی و اسپوروگونی را دوره جنسی یا اسپوروژنی می نامند (۱).

۲) مرحله غیرجنسی یا خارج روده ای یا فاز توکسوپلاسمیک (Toxoplasmic Phase): انواع میزبان ها از طریق خوردن کیست نسجی و یا اووسیست به این انگل مبتلا می شوند. در دستگاه گوارش میزبان، دیواره ی کیست تحت تاثیر آنزیم های مترشح از قبیل پپسین، تریپسین و اسید کلریدریک از بین رفته و منجر به آزاد شدن برادی زوئیتها/ اسپوروزوئیت ها می شوند. این تک یاخته ها پس از نفوذ از دیواره روده از طریق عروق مزانتر و لنفاوی در بافت های مختلف پراکنده می شوند. در بافت ها ارگانسیم ها وارد سلولهای هسته دار شده و از طریق اندودیوژنی تقسیم می شود و سلول میزبان مملو از تاکی زوئیت می شود که به سلول حاوی تاکی زوئیت ها اصطلاحاً کیست کاذب گفته می شود. پس از انجام تقسیمات، کیست کاذب پاره شده و تاکی زوئیتها خارج می شوند و دوباره به سلولهای هسته دار جدید حمله می کنند. معمولاً پس از حدود یک هفته از شروع عفونت تعدادی از انگل ها پس از ورود به داخل سلول ها به کیست تبدیل می شوند که انگل داخل آنها به فرم برادی زوئیت در می آید.

در میزبان های مقاوم معمولاً در عرض کمتر از یک ماه تهاجم و تکثیر سلولی تاکی زوئیت ها به واسطه عملکرد ایمنی میزبان کاملاً مهار شده و انگل یکپارچه کیست سازی کند (۱).

راههای انتقال توکسوپلازما گوندی

توکسوپلازما دارای دو راه اصلی انتقال اکتسابی و یک راه اصلی انتقال مادرزادی است.

راههای انتقال انگل به طریق اکتسابی

۱- مدفوعی-دهانی: انسان معمولاً با خوردن سبزیجات، مواد غذایی و آب آلوده به مدفوع گربه حاوی اوووسیست آلوده می شود. به نظر می رسد که اوووسیست یکی از مناسب ترین فرم های بیماری زای انگل باشد. علفخواران به هنگام چریدن در مزارع و پرندگان به هنگام دانه خواری به اوووسیست آلوده می شوند (۵).

۲- گوشتخواری بامصرف گوشت خام یا نیم پز: کیست های نسجی در بافت های حیوانات اهلی که انسان از گوشت آنها تغذیه می کند عامل مهمی در آلودگی انسان به این انگل است. انسان معمولاً با خوردن گوشت خام و سایر فرآورده های گوشتی آلوده که حرارت کافی ندیده اند، می تواند به این انگل مبتلا شود (۵).

۳ انتقال مادرزادی: یکی از راههای انتقال بیماری توکسوپلاسموزیس مادرزادی از طریق جفت به جنین می باشد که تشخیص این بیماری را در این مرحله بسیار حائز اهمیت است. توکسوپلاسموز مادرزادی طیف بالینی گسترده ای دارد و از تولد نوزاد بدون علامت تا نوزاد با عوارض شدید مغزی و چشمی و حتی سقط متفاوت است (عوارض توکسوپلاسموزیس مادرزادی نظیر تب، تا عقب افتادگی ذهنی نوزادان متفاوت است).

راه های کم شایع انتقال:

۱. انتقال از راه خراش و زخم: این نوع انتقال بیشتر در کارکنان کشتارگاهها و کشاورزان اتفاق می افتد.

۲. انتقال از راه پیوند عضو: پیوند عضو از دهنده آلوده به گیرنده غیر ایمن می تواند سبب انتقال توکسوپلازما شود که معمولاً به این طریق کیست های نسجی دخالت دارند (۵).

۳. انتقال طریق شیر خام و از تخم مرغ و اشک و بزاق: این انگل می تواند ۴ تا ۷ روز در بزاق، اشک، ادرار و شیر زنده بماند (۱).

۴. انتقال از راه بندپایان: بندپایان در انتقال مکانیکی انگل می توانند نقش داشته باشند. نقش انواعی از مگس ها، سوسک ها و کنه های ایکسودیده در انتقال این انگل مشخص شده است (۶).

انتشار جغرافیایی و شیوع توکسوپلازما در نقاط مختلف کره زمین: توکسوپلازما انتشار گسترده جغرافیایی دارد. به طوری که از مناطق گرمسیر استوایی تا مناطق سردسیر قطبی شایع است. این انگل از شیوع بالایی در انسان و حیوانات برخوردار است که میزان شیوع آلودگی های انسانی با توجه به اقلیم، عادات غذایی، وفور گربه و سن افراد متفاوت است. میزان شیوع توکسوپلازما از کمتر از ۱۰٪ تا بیش از ۷۰٪ گزارش شده است. بر اساس گزارشات منتشره در دهه اخیر، ۶۸/۴٪ از ۲۶۳ زنان باردار مراجعه کننده برای مراقبت های پیش از زایمان در اتیوپی (۷)، ۸۳/۵٪ از ۳۸۲ دانش آموزان ابتدائی در جنوب نیجریه (۸)، ۴۲/۹٪ از زنان باردار مراجعه کننده در شمال غربی ترکیه (۹)، ۵/۹٪ از ۳۵۶ بیمار مبتلا به سرطان در شرق چین

(۱۰)، ۱۷/۳۰٪ از ۴۴۵ بیماران روانی در شرق چین (۱۱)، ۱۵/۱۳٪ از ۱۵۰۰ دانش آموزان در دو استان چین (۱۲)، ۸۵٪ از ۳۹۰ کشاورز، ماهیگیر و ماهی فروش در غنا (۱۳)، ۳۵/۴٪ از ۴۸ زنان با سقط جنین در هند (۱۴)، ۳۲ نفر از بین بیش از ۹۷ بیمار مبتلا به ایدز در ایالت Telangana State در جنوب هند (۱۵) از نظر آنتی بادی ضد توکسوپلازما مثبت بودند.

انتشار جغرافیایی و شیوع توکسوپلازما در نقاط مختلف ایران: بر اساس مطالعات انجام شده در ایران حداقل ۲۰ درصد افراد در اکثر مناطق کشور از نظر آنتی بادی ضد توکسوپلازما مثبت می باشند و بیشترین آلودگی از استان های شمالی کشور گزارش شده است. ۲۸/۸٪ از ۵۰۰ نمونه سرم افراد اهدا کننده خون در جنوب غربی ایران (کرمان) (۱۶)، ۲۴/۶٪ زنان با سقط جنین و ۲۱/۵٪ زنان با زایمان طبیعی در بین ۲۶۰ نمونه در اهواز (۱۷)، ۲۷/۴٪ از ۵۰۱ زنان باردار در خوزستان (۱۸)، ۱/۴٪ و ۳۷/۲٪ به ترتیب از نظر آنتی بادی IgM و IgG در بین ۵۰۰ زنان باردار در زنجان (۱۹)، ۳۴٪ از ۴۰۰ خانم مراجعه کننده برای آزمایشات پیش از ازدواج در قزوین (۲۰)، ۷۱٪ از ۶۱۲ خانم باردار در ساری (۲۱)، ۱۲/۴٪ از ۴۰۲ دانش آموز شهری و ۲۵/۹٪ از ۱۴۷ دانش آموز روستایی در آذربایجان (۲۲)، ۱۹/۳٪ از ۲۸۶ اهدا کننده خون در جنوب ایران (۲۳)، ۳۵/۱٪ از ۱۷۳ نمونه سرم بیماران مراجعه کننده به بیمارستان علی نسب در تبریز (۲۴) از نظر آنتی بادی ضد توکسوپلازما مثبت بودند.

بیماریزایی و علائم بالینی توکسوپلاسموز

احتمالا انگل توکسوپلازما گوندی ای سازگارترین انگل در بین تمام انگل هاست و قادر به زندگی طولانی در بدن میزبان خود حتی برای تمام عمر است. بیشتر مبتلایان فاقد علائم بالینی

هستند و نسبت کمی از آنها علامت دارند. بیماریزایی توکسوپلازما مربوط به مرحله حاد عفونت است یعنی مرحله ای که انگل به فرم تاکی زوئیت به سلول ها تهاجم برده و سبب تخریب سلولی می شود. مراحل حاد آن می تواند در بافت های مختلف مانند مغز، غدد لنفاوی، کبد، قلب و چشم اتفاق افتد. در مرحله مزمن که انگل فقط به صورت کیست وجود دارد، هنوز به طور قطع بیماریزایی آن مشخص نشده است. هر چند به استناد نتایج مطالعات اپیدمیولوژی سال های اخیر، ممکن است توکسوپلازما در بروز برخی موارد بیماری ها ی روان پریشی مثل اسکیزوفرنیا و یا صرع کریپتوژنیک نقش داشته باشد.

۸۰-۹۰ درصد آلودگی ها به این انگل بدون تظاهر آشکاری از بیماری است. شایع ترین فرم توکسوپلاسموز در افراد با کفایت عملکرد سیستم ایمنی سرویکال لنفادنوپاتی است که معمولاً خوش خیم و خود محدود شونده است. تابلوی بیماری ممکن است شبیه منونوکلئوزیس عفونی همراه با تب، سردرد، درد عضلات، التهاب غدد لنفاوی و خستگی مفرط باشد (۱).

در افراد با اختلال عملکرد سیستم ایمنی توکسوپلاسموز یک فرصت طلب مهم است که می تواند تهدید کننده زندگی افراد باشد. متعاقب اختلال یا نقص ایمنی ممکن است راکتیویشن عفونت های نهفته توکسوپلازما اتفاق افتد که در این موارد عمدتاً توکسوپلاسموز مغزی بروز می کند و با ضایعات کانونی وسیع در مغز همراه است. شایعترین تظاهر توکسوپلاسموز در بیماران مبتلا به ایدز آنسفالیت است که در فرم منتشره آنسفالیت توکسوپلاسمایی سیر بسیار پیش رونده ای دارد و در مدت کوتاهی باعث مرگ افراد می شود. توکسوپلاسموز مادرزادی متعاقب عفونت اولیه دوران بارداری اتفاق می افتد و حدود ۳۰ تا ۴۰٪ افرادی که در طی

بارداری به عفونت اولیه توکسوپلازما آلوده می شوند جنین با توکسوپلازما سموز مادرزادی خواهند داشت. فراوانی انتقال مادرزادی با شدت توکسوپلازما سموز مادرزادی رابطه عکس دارد. اکثر انتقال در اواخر بارداری است و عفونت های اواخر بارداری معمولاً بدون علائم آشکاری در نوزادان می باشد و یا اینکه سبب علائم عمومی در نوزادان می شود. بسیاری از نوزادانی که در اوایل تولد بدون علامت آشکاری هستند در سال های بعد با فعال شدن انگل، ضایعات چشمی بروز می دهند. اثرات بینایی توکسوپلازما سموز مادرزادی از کاهش دید و تاری دید تا کوری متفاوت است. در سه ماهه اول و دوم بارداری، جنین در معرض توکسوپلازما سموز شدید است که می تواند اثرات مغزی و چشمی ماندگاری ایجاد کند و ندرتاً ممکن باعث سقط شود. سه نشانه عمده توکسوپلازما سموز مادرزادی هیدروسفالی یا میکروسفالی، کوریوریتیت و کلسیفیکاسیون مغزی است که به تریاد سابین نیز معروف است.

تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلازما سموز

در توکسوپلازما سموز علائم کلینیکال اختصاصی نبوده و تشخیص آزمایشگاهی آن بسیار مهم است. تست های تشخیص آزمایشگاهی عبارتند از: ۱. روش سرولوژی ۲. جداسازی انگل از خون، مایعات و بافت های بدن ۳. روش ایمونوپراکسیداز ۴. پاتولوژی ۵. روش مولکولی (۱). سرولوژی: به طور کلی روش معمول تشخیص، سرولوژی است. چالش اصلی تشخیص سرولوژیک توکسوپلازما سموز، تمایز عفونت های فعلی از قبلی است. انواع تست های سرولوژی برای تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلازما سموز استفاده می شود که عبارت است از:

- آزمون رنگی سابین فیلدمن (Sabin-Feldman dye test) DT
- IFA (Indirect immunofluorescent antibody Assay)
- ISAGA (Immunosorbent Agglutination Assay)
- ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay)
- AC/HS test (Differential agglutination test)
- MAT (Modified Agglutination Test)
- IgG avidity Test
- Western Blot

علیه توکسوپلازما انواع آنتی بادی IgG، IgA، IgE و IgM تولید می شود. IgM نخستین آنتی بادی است که تولید می شود که معمولاً در عرض کمتر از ۱ هفته از آلودگی قابل تشخیص است و بعد از ۲ هفته به حداکثر مقدار و بعد از ۳ تا ۴ ماه قابل تشخیص نیست. IgG با یک تاخیر چند روزه از IgM تولید می شود و بعد از حدود ۲ تا ۳ ماه به حداکثر رسیده و کاهش کند و تدریجی دارد و معمولاً سال های طولانی یا مادام العمر قابل تشخیص است. در تشخیص اولیه سرولوژیک توکسوپلاسموز این دو آنتی بادی به طور همزمان مورد سنجش قرار می گیرد. اثبات IgG ضد توکسوپلازما به تنهایی عفونت نهفته یا قبلی تلقی می شود ولی مثبت بودن هر دو آنتی بادی به احتمال قوی نشان دهنده عفونت اخیر است. آنتی بادی های IgE و IgA هم مثل IgM می توانند شاخص عفونت اخیر باشند. یک مشکل اساسی آنتی بادی IgM و IgA به عنوان شاخص عفونت این است که در برخی از افراد دوام این آنتی بادی در بیماران طولانی است و در مرحله مزمن هم قابل تشخیص هستند. به همین جهت تفکیک عفونت اخیر از قبلی را با مشکل مواجه می کند. در این موارد برای

تشخیص دقیق تر از تست های تأییدی استفاده می شود که یکی از مهمترین تست های تأییدی **IgG avidity** است. اساس تست اویدیتی قوت اتصال آنتی بادی های **IgG** به آنتی ژن های توکسوپلازما می باشد. آنتی بادی هایی که در اوایل عفونت تولید می شوند اتصال آنها به آنتی ژن قوی نیست و به واسطه اوره آنتی بادی ها از آنتی ژن ها جدا می شوند. معمولاً بعد از ۳ تا ۵ ماه آنتی بادی هایی که تولید می شوند به قوت به آنتی ژن چسبیده و اوره قادر نیست اینها را از آنتی ژن جدا کند. شاخص این تست **Index avidity** است که به صورت **Low avidity , high avidity** و **borden line** گزارش می شود. در عفونت های اخیر (کمتر از ۳ تا ۵ ماه) نتایج تست **Low avidity** است و بعد از آن به سمت **High avidity** کشیده می شود. مشکل این تست این است در برخی از افراد **Low avidity** هم دوام طولانی داشته و در مرحله مزمن ممکن است نتیجه همین باشد به همین جهت امروزه در مراکز معتبر مثل **CDC (Centers for Disease Control and Prevention)** پنلی از تستهای سرولوژی برای اشکال مختلف بالینی استفاده می شود. مهمترین کاربرد **IgG avidity** برای رد عفونت دوره بارداری در سه ماهه اول بارداری است. به عبارتی زنان بارداری که سه ماهه اول بارداری آزمایش شده و نتیجه آزمایش آنها **High avidity** است دلالت بر این دارد که عفونت آنها مربوط به پیش از بارداری است و خطری هم برای جنین وجود ندارد.

جداسازی انگل از خون و مایعات بدن: در این روش از تلقیح داخل صفاقی نمونه به موش های سفید کوچک آزمایشگاهی و یا کشت سلولی استفاده می شود. جداسازی انگل از خون و

مایعات بدن و همینطور بافت‌های نوزادان نشان دهنده عفونت اخیر یا حاد است ولی جداسازی انگل از بافت‌های افراد بزرگسال و کودکان دلیل قطعی بر عفونت اخیر نمی تواند باشد. معایب روش جداسازی این است که زمانبر است و انجام آن در هر کجا امکان پذیر نیست (۱).

روش مولکولی یا PCR (Polymerase Chain Reaction): از این روش برای تشخیص توکسوپلازما در خون، مایعات بدن و بافت‌ها استفاده می شود. تشخیص توکسوپلازما در خون و مایعات نشان دهنده عفونت اخیر توکسوپلازما است ولی نتایج مثبت PCR در نمونه های بافتی دلیل قطعی بر عفونت اخیر نیست. بیشترین کاربرد PCR در تشخیص توکسوپلاسموز در موارد عفونت های مادرزادی و تشخیص آلودگی در جنین است . برای این منظور مایع آمنیون به روش PCR مورد آزمایش قرار می گیرد. گفته شده که PCR انقلابی در تشخیص توکسوپلاسموز مادرزادی ایجاد کرده است (۱).

روش هیستوپاتولوژی: از این روش برای تشخیص توکسوپلاسموز در بیوپسی غدد لنفاوی استفاده می شود. ظاهر پاتولوژیک غدد لنفاوی در آلودگی به توکسوپلازما تا حدی اختصاصی است ولی همواره متمایز کننده نیست.

روش ایمونوپراکسیداز: این روش، روش مناسبی برای تشخیص توکسوپلاسموز در نمونه بیوپسی در بیماران با آنسفالیت است که با این روش ناکی زوئیت ها قابل تشخیص می باشند (۱).

درمان توکسوپلاسموز

درمان توکسوپلاسموز اکتسابی در افرادی که بدون علائم بالینی هستند و یا آنکه سرویکال لنفادنوپاتی بدون علائم دارند، ضرورت ندارد. در سایر موارد توکسوپلاسموز مستلزم درمان دارویی است. داروهای ضد توکسوپلازما بر روی تاکی زوئیت ها مؤثرند و بر کیست های نسجی اثری ندارند و یا اینکه اثرشان ناچیز است. درمان رایج توکسوپلاسموز، ترکیبی از دو داروی پری متامین یا داراپریم (Pryimetarmin or Daraprim) و سولفادiazین (Sulfadiazine) می باشد که اثر برهم افزایی (سینرژستیک) دارند. پری متامین و سولفونامید در جلوگیری از سنتز اسیدهای نوکلئیک انگل نقش دارند. پریمتامین آنتاگونیست اسید فولیک است و باعث اختلال در خون سازی می شود. لذا، به همراه این داروها بایستی اسید فولینیک نیز تجویز شود. در بیماران با اختلال عملکرد سیستم ایمنی با این پروتکل درمانی ۸۰٪ - ۶۰٪ بهبودی وجود دارد. با توجه به عوارض این دارو، در طول حاملگی از داروی اسپیرامایسین استفاده می شود (۱). کلیندامایسین، داپسون و اتوواکون (Atovaquone) داروهای آلترناتیو توکسوپلاسموز می باشند. کلیندامایسینیک آنتی بیوتیک ضد باکتری بوده ولی در توکسوپلاسموز چشمی مؤثر است و همچنین با ترکیب سولفادiazین در درمان آنسفالیت توکسوپلاسمایی مورد استفاده قرار می گیرد (۲۵). اسپیرامایسین (Spiramycin) به همراه پردنیزولون در بیماران توکسوپلاسموز چشمی کاربرد دارد. همچنین در زنان باردار با توجه به اینکه پریمتامین اثر سوء دارد، این دارو قابل استفاده است که تا ۶۵٪ انتقال بیماری را کاهش می دهد. این دارو با دوز ۴-۲ گرم روزانه و به مدت ۴-۳

هفته مصرف می شود (۲۶). آتوواکون (Atovaquone) همراه با پری متامین یا سولفادiazین روی کیست های نسجی انگل تا اندازه ای و نیز در درمان انسفالیت توکسوپلاسمایی حاد در بیماران مؤثر است (۱).

کنترل و پیشگیری توکسوپلاسموز

مهمترین اقدامات پیشگیری کننده از توکسوپلاسموز عبارتند از: پختن و فریز کردن گوشت، انگل زدایی سبزیجات، جلوگیری از خاک بازی کودکان، رعایت بهداشت در نگهداری گربه و غربالگری زنان باردار. رعایت اصول پیشگیری توکسوپلاسموز در دو گروه بسیار مهم است که عبارتند از: زنان حامله ای که از نظر سرولوژی توکسوپلاسمای منفی می باشند و افراد که دچار سندروم نقص ایمنی اکتسابی و مبتلا به بدخیمی های خونی هستند. همچنین افرادی که تحت درمان داروهای سایتوتوکسیک یا ایمونوساپرسیو می باشند (۱).

تاریخچه استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی: اطلاعات مربوط به اثرات و خواص دارویی گیاهان از زمان های بسیار دور به تدریج به دست آمده و سینه به سینه منتقل گشته است. بر طبق سنگ نوشته ها و شواهد دیگر به نظر می رسد مصریان و چینیان در زمره اولین جمعیت های بشری بوده اند که فراتر از ۲۷ قرن قبل از میلاد مسیح از گیاهان به عنوان دارو استفاده می کردند. مردم یونان باستان خواص دارویی گیاهان را به خوبی می دانستند. بقراط حکیم بنیانگذار طب یونان قدیم و شاگرد وی ارسطو برای استفاده از گیاه در درمان بیماری ها ارزش زیادی قائل بودند. آنها علاوه بر استفاده از گیاهان یونان از گیاهان کشورهای دیگر نیز استفاده می کردند. دیوسکورید در قرن اول میلادی مجموعه ای از ۶۰۰ گیاه دارویی با ذکر

خواص درمانی هر یک را تهیه و به شکل کتابی درآورد که این کتاب بعدها سرآغاز بسیاری از مطالعات علمی در زمینه گیاهان مذکور گردید بطوریکه مثلاً جالینوس پزشک معروف یونانی در کارهای خود از کتاب دیوسکورید استفاده کرد. در قرون هشتم تا دهم میلادی دانشمندان ایرانی، ابوعلی سینا، محمد زکریای رازی و دیگران به دانش درمان با گیاه رونق زیادی دادند و کتابهای چون قانون و الحاوی را به رشته تحریر درآوردند (۲۷).

مروری بر انواع گیاهان دارویی مورد استفاده برای درمان عفونت ها در طب سنتی: در طب سنتی ایران و دیگر کشورها از دیرباز از انواع گیاهان دارویی برای درمان انواع بیماری ها استفاده شده است. معمولاً گیاهان دارویی دارای مجموعه ای از اثرات بر روی انواعی از بیماری ها می باشند. در زیر به اثرات انواع گیاهان دارویی در طب سنتی اشاره می شود. به طوری که از ریشه، برگ و سر شاخه های هوایی گیاه سرخارگل در درمان عفونت های قارچی، عوارض جانبی ناشی از اشعه درمانی، آرتریت روماتوئید، مسمومیت خونی، مسمومیت های غذایی، درمان زخم های چرکی، آبسه، تبخال، التهاب بافت های پیوندی، زخم، سردرد اختلالات متابولیکی و همچنین در درمان حمایتی سرماخوردگی، عفونت های دستگاه تنفسی و ادراری به علت تحریک پاسخ ایمنی استفاده می شود. از ریزوم و ریشه ی خشک شده گیاه شیرین بیان در درمان گلو درد، سرفه، زخم های معده و اثنی عشر، سوئ هاضمه، واکنش های آلرژیک، روماتیسم، آرتریت، صرع، بی اشتها، آپاندیسیت، کزاز، دیفتری استفاده می شود. از گل های ماده مخروطی شکل گیاه رازک در درمان بی خوابی بخصوص اشکال در بخواب رفتن، کرمپ های شکمی، کم خونی، عفونت باکتریایی، درماتیت، اسهال، لکوره،

میگرن، ادم، مسکن، ضد کرم، ضد تب، ضد نفخ، کمک به هضم غذا استفاده می شود. از برگ ها و میوه گیاه زیتون در درمان عفونت های گوناگون باکتریایی، ویروسی و قارچی و همچنین تب بر، قابض، ضد عفونی کننده پوست، مفید در درمان مالاریا، کاهنده فشار خون، مفید در درمان دیابت نوع دوم می باشد. عصاره برگ درخت گردو خاصیت میکروب کشی و باکتری کشی، در درمان سردرد، سرماخوردگی و بیماریهای پوستی بکار میرود. از روغن دانه های کرچک به عنوان مسهل، درمان مسمومیت های غذایی، ضد کرم، بر طرف کننده سوزش چشمی، درمان زگیل، درمان راش، جوش، کفگیرگ، آبسه استفاده می شود. از میوه رسیده و خشک شده نخل اره ای به عنوان مدر، درمان التهاب حنجره، بی اشتهایی، آلرژی، درمان سیاه زخم، سل، التهاب مثانه، گلودرد و ضد عفونی کننده مجاری ادراری استفاده می شود. دانه و اسانس رازیانه دارای خواص خلط آور، باد شکن، ضد میکروب، ضد التهاب و مدر میباشد (۲۸). برگ گیاه گزنه دارای خواص قابض، در گرفتگی عضلات، درمان اسهال و بواسیر کاربرد دارد. از سر شاخه های گیاه آویشن در درمان عفونت های انگلی، میکروبی، آسم، قابض، التهاب مزمن معده استفاده می شود. از دانه های خاکشیر در التیام زخمها، رفع اسهال، تب بر و رفع کرم استفاده میشود. آنغوزه گیاهی است که دارای خواص ضد تشنج، کرم و رفع یبوست استفاده می شود (۲۷).

مروری بر گرایش های تحقیقاتی در زمینه گیاهان دارویی و تجاری سازی فراورده های گیاهی در دهه های اخیر:

داروهای سنتتیک علیرغم کارآیی فوق العاده در درمان بسیاری از بیماری ها، دربرخی موارد با محدودیت هایی همراه هستند. به همین جهت امروزه پژوهش بر روی گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها به طور روزافزون رویکرد جهانی دارد و استفاده از گیاه درمانی و داروهایی با منشا گیاهی در سالهای اخیر روبه فزونی است. گرایش به پژوهش بر روی گیاهان دارویی در جهان به طور قابل توجهی در دو سه دهه اخیر افزایش یافته است. تلاش هایی هم که در این زمینه در سال های اخیر در کشور های مختلف انجام شده است به تولید فراورده های دارویی منتهی شده است که امروزه فرم تجاری آنها قابل عرضه در داروخانه ها می باشد (۲۹). از جمله این محصولات اسپری بینی سینول از گیاه اکالیپتوس، پماد رزماری از گیاه اکلیل کوهی، پماد کالاندینیکس از گیاه همیشه بهار، شربت باریج آلوئه ورا از گیاه صبر زرد، قرص روکشدار گاسترین از گیاه شیرین بیان، قطره ضد نفخ از گیاه نعنا، قطره ایمونوساپورت از گیاه سرخارگل، قطره شیر افزا از گیاه رازیانه، قطره گاسترولان از رازیانه، قطره کولتیک از شوید، محلول بخور اکالیپتوس از گیاه اکالیپتوس، قرص چای سبز (کام کرین) از گیاه چای سبز، کرم کاپسایسین-ناژو از گیاه فلفل قرمز، محلول خوراکی خلط آور زردبند از گل ختمی (۶۰).

مروری بر گیاهان مورد مطالعه، خواص درمانی و ترکیبات تشکیل دهنده آنها

در این مطالعه، اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی، شامل گیاهان زنیان، افسنطین، چای کوهی و بومادران بر تاکی زوئیت های توکسوپلاسم در محیط *in vitro* و کشت سلول مورد ارزیابی قرار گرفت.

گیاه افسنطین: این گیاه با نام علمی *Artemisia absinthium* گیاهی چند ساله و علفی از خانواده ی کاسنی (مرکبان) است و معروف به *worm wood* می باشد. گیاهی است پایا، به ارتفاع ۴۰ تا ۶۰ سانتیمتر و حتی یک متر که به حالت انبوه در زمینهای بایر سنگلاخی کنار جاده ها و دامنه کوهستانها تا ارتفاعات ۲۰۰۰ متری می روید. پراکندگی آن به صورتی است که در نواحی مختلف فرانسه، دامنه های آلپ، پیرنه سویس، بلژیک و در آسیا مانند ایران و سیبری می روید. این گیاه در ایران در مناطقی چون اطراف دماوند، دشت های اطراف البرز، ارومیه، تبریز و دامنه های سبلان می روید (۳۱ و ۳۰). قسمت مورد استفاده این گیاه برگ و سرشاخه گلدار آن است. ماده موثره افسنطین جزء گروه روغنهای فرار ستونی می باشد و عبارتند از روغن فرار (۲٪ تا ۱/۴ درصد) محتوی ایزوتوچون (Isothujone)، الکلهای توجیل (Thujyl alcohols)، گاهی مقدار کم کامازولن آبی و ترپینها. علاوه بر ترکیبات فوق، این گیاه حاوی مقداری مواد تلخ مثل ارتابسین (Artabsin)، افسنطین (Absinthin)، انافسنطین (Anabsinthin) و فلاونها می باشد.

خواص درمانی افسنطین: از نظر درمانی این گیاه اثر ضد کرم و ضد مالاریا دارد. همچنین، افسنطین دارای اثر مقوی، مقوی قلب، تب بر، مدر، قاعده آور و ضد عفونی کننده است. افسنطین از مقوی های مهم دستگاه هاضمه به شمار می آید. زیرا با مصرف آن، اشتها زیاد می گردد، انقباضات الیاف ماهیچه های معده و روده تقویت می یابد و یبوست های ناشی از ضعف عمل دستگاه هضم نیز برطرف می شود. از افسنطین نتایج خوبی در رفع اسهال های

مزمّن، نفخ، و تب های نوبه گرفته شده است. هر چند که افسنطین سبب دفع آسکاریس لومبریکوئیدس و کرمک می شود ولی بر روی کرم کدو تاثیر ندارد (۲۷).



Artemisia absinthium

(افسنطین)

بومادران: با نام علمی *Achillea millefolium* گیاهی از خانواده *Compositae* است. گیاهی است پایا به ارتفاع ۲۰ تا ۹۰ سانتیمتر و حتی بیشتر که به طور خودرو در دشت ها، کنار جاده ها و نواحی کوهستانی نقاط مختلف اروپا و ایران می روید. مرکز اصلی رویش بومادران، اروپا و آسیای غربی است. این گیاه در ایران در مناطقی چون اطراف دماوند، دشت های اطراف البرز، ارومیه، تبریز و دامنه های سبلان، گرگان، آذربایجان شرقی، بیجار، همدان، اطراف

تهران در قزوین، دامغان، سمنان و شاهرود می روید. از کلیه قسمت‌های این گیاه، بوی قوی استنشام می شود. به طوری که به مجرد دست زدن به اعضای گیاه این بو احساس می گردد (۳۳ و ۳۲).

قسمت مورد استفاده این گیاه سرشاخه گلدار و برگ آن است که طعم تلخ و بوی قوی دارند. ترکیبات شیمیایی در سرشاخه گلدار بومادران عبارتند از: پروآزولن، آلکالوئیدها مثل بتونیسین (Betonicin)، استاشیدرین (Stachydrin)، فلاونها اسانسهای فرار محتوی کامازولن (Chamazulene) می باشد.

خواص درمانی: بومادران گیاهی است که تاریخ استفاده از آن برای درمان بیماریها باید به زمانهای خیلی قدیم نسبت داده شود. در قرون وسطی بومادران را برای بندآوردن خونریزی های بینی، اختلالات قاعدگی، بیخوابی، اختلالات بینائی، وجود خون در ادرار، اخلاط خونی، صرع و غیره بکار می برده اند. بومادران دارای اثر مقوی نیرو دهنده، ضد تشنج، رفع بواسیر، قاعده آور، بند آورنده خون و التیام دهنده زخم و جراحات است. دم کرده سرشاخه گلدار بومادران در رفع گاستریت های حاد و مزمن، رفع نفخ و ترش کردن غذا، اثر نافع ظاهر می کند ضمناً سوء هضم های ناشی از نفخ را از بین می برد. بومادران به علت دارا بودن تانن و مواد تلخ و عطری، بر روی سلسله اعصاب و قلب نیز اثر می نماید. به طوری که در موارد درمانی مختلف مانند خستگی عمومی، ضعف قلب، ورم ماهیچه های قلب و همچنین در بیماریهای عصبی مانند ضعف اعصاب، صرع و قولنج های تشنج آور نتایج مفید می دهد (۲۷).



Achillea millefolium

(بومادران)

غوزه پنبه: غوزه پنبه با نام علمی *Gossypium hirsutum* از گیاهان گلدار دسته نهان دانه

و زرده دو لپه ای جدا گلبرگها جز تیره پنبه‌کان می باشد. کپسول آن دارای ۳ تا ۴ یا ۵ کیسه پر

از دانه های پوشیده از رشته های سفید سلولزی است و آنرا غوزه (جوزقه) نامند. این گیاه دارای جنس های آمریکایی و ایرانی و هندی است و الیاف جنس آمریکائی آن طویل تر است. در ایران جنس آمریکائی را در دو نقاط مختلف کاشته و بهترین آن بنام پنبه فیلهستانی معروف است. زراعت آن یکی از منابع مهم ثروت کشورهای نسبتاً گرم محسوب می شود. تعداد گل در روی بوته غوزه پنبه برحسب نژاد و نوع متفاوت است و معمولاً ۳ تا ۸ گل روی هر شاخه وجود دارد. محل رویش آن در ایران در آذربایجان در باغات اطراف تبریز، خراسان، جنوب و جنوب شرقی می باشد (۲۷ و ۳۳).



Gossypium hirsutum

(غوزه پنبه)

چای کوهی: چای کوهی با نام علمی *Hypericum perforatum* گیاهی است علفی، پایا با بوته‌های کوتاه به ارتفاع ۲۰-۶۰ سانتیمتر و ساقه‌های آن کرکدار است. جز خانواده نعنائیان (*Laminacea*) با ۲۲۰ جنس و ۴۰۰ گونه یکی از بزرگترین و مهمترین خانواده‌های گیاهی محسوب می‌شود. دارای گونه‌های مختلفی است که در ایران، عراق، قفقاز، افغانستان، ترکمنستان و آسیای مرکزی می‌رویند (۳۴ و ۳۵). دو مرکز مهم تنوع برای این جنس پیشنهاد شده است، اولی شامل مناطق شمال و شرق قفقاز، شمال غرب ایران و شمال عراق و دومی شبه جزیره بالکان می‌باشد. چای کوهی گیاه دارویی مهم و بومی ایران است. این گیاه در ارتفاع کم و متوسط رویش دارد و در بیشتر مناطق ایران، مانند همدان، دیده می‌شود. این گیاه در ایران با نام‌های چای کوهی، گل کفته، کرک خرگوش و توکلیجه و در زبان انگلیسی به نام *Betony* معروف است.

خواص درمانی: عصاره بخش هوایی این گیاه در طب سنتی ایران در درمان عفونت، آسم و بیماری‌های التهابی به خصوص روماتیسم استفاده می‌شود. این گیاه علاوه بر اثرات ضد میکروبی دارای خاصیت ضد درد به ویژه دردهای مفصلی، رماتیسمی، سردرد، سرگیجه و دردهای عصبی است. ترکیبات فعال این گیاه که دارای فعالیت بیولوژیکی هستند شامل فنیل اتانوئید، تربینوئید و فلاونوئید می‌باشد. از جمله ترکیبات دیگر گیاه می‌توان به میرسن (۲۰ درصد)، آلفائینین (۱۸ درصد)، گامامورولن (۱۳/۲ درصد) و اگنول (۷ درصد) اشاره کرد. اثرات درمانی، آرام‌بخشی، ضد استرس و ضد التهاب این گیاه به ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن، که بخشی از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند، نسبت داده می‌شود. اثرات

ضد میکروبی این گیاه علیه استرپتوکوکوس سانگوئیس (*Streptococcus sanguinis*) نیز شناخته شده است. همچنین این گیاه در طب سنتی برای درمان عفونت‌های مجاری تنفسی به کار می‌رود (۲۷ و ۳۶).



Hypericum perforatum

چای کوهی

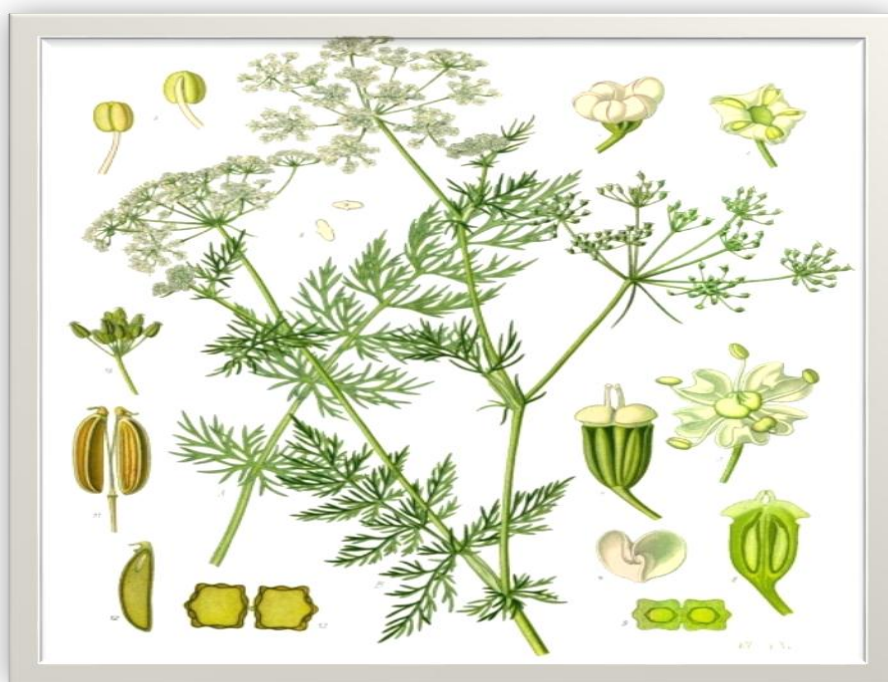
زنیان: با نام علمی *Carum copticum* متعلق به خانواده چتریان (*Umbelliferae*)

می‌باشد زنیان گیاهی است علفی، بوته ای و یکساله که ارتفاع آن تا ۹۰ سانتی متر می‌رسد (۳۷). قسمت مورد استفاده گیاه میوه های آن است. این میوه ها کوچک، بیضی شکل و به رنگ زرد مایل به قهوه ای بوده و دارای اسانس با بوی نافذ و مشابه آویشن می‌باشند. بر روی میوه ها پنج خط طولی نازک وجود دارد که روشن تر از رنگ میوه هستند. زنیان به صورت خودرو در نواحی شرقی هندوستان، ایران و مصر می‌روید و در همین نواحی و بسیاری از نقاط با آب و هوای مشابه کشت نیز می‌شود. مهم ترین مناطق رویش این گیاه در ایران، سیستان و بلوچستان، آذربایجان، اصفهان، خوزستان، فارس، کرمان و خراسان است.

ترکیبات مهم زنیان: میوه های گیاه حاوی ۲ تا ۴ درصد اسانس می‌باشد. مهم ترین اجسام اسانس شامل تیمول به میزان ۳۵ تا ۶۰ درصد، پاراسیمن (*Cymene*)، گاما ترپینن (*Gama trepinene*)، آلفا و بتا پینن (*Alpha-Bete pinene*)، سابینن (*Sabinene*) است. گذشته از ترکیبات اسانس، ترکیبات گلوکزیدی و ساپونینی نیز در گیاه وجود دارد. زنیان از قدیم به عنوان ادویه و نگهدارنده مواد غذایی مورد استفاده بوده است. از اسانس آن تحت نام آجوان (*Ajowan*) در هندوستان به عنوان یک ضد میکروب قوی (مشابه تیمول) استفاده می‌شود. همچنین از آن به عنوان ضد قارچ پوستی و ضد نزله تنفسی می‌توان استفاده کرد. یکی دیگر از کاربردهای زنیان به عنوان ضد کرم و ضد حشره است. ضد اکسیدان، ضد تب، ضد میکروب، ضد اسپاسم، افزایش دهنده ی قوای جنسی، ضد نفخ، ضد آسم، ادرار آور، معرق،

خلط آور، قاعده آور، ضد قارچ، محرک معده، کاهش دهنده ی پرفشاری خون، مسهل، شیرافزا

و مقوی معده است (۲۷).



Carum copticum

(زنیان)

مروری بر آزمایش MTT، اساس تست و کاربرد آن:

[3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide
=(MTT)]

از تست MTT جهت تعیین رشد سلولی، اثر سیتوتوکسیسیته دارو و حساسیت دارویی استفاده می شود. در بعضی مواقع از این روش صرفاً جهت تعیین و مقایسه مقدار رشد سلول در محیط های مختلف استفاده می شود. اساس این تست تبدیل ماده MTT با نام علمی ۳-۴،۵ Dimethylthiazol به کریستال فورمازان است که مقدار تولید شده این ماده حاکی از فعالیت میتوکندری در سلول های زنده است. در نتیجه مقدار تبدیل این ماده نسبت مستقیمی با تعداد سلول های زنده دارد. این روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول های زنده استوار است که MTT قادر به عبور از غشای سلولها میباشد. پس از ورود MTT به سلولهای سالم، حلقه تترازولیوم آن را می شکند و آن را به کریستال های نامحلول فورمازان تبدیل می کند. حاصل آن تغییر رنگ از زرد به بنفش می باشد. در حالی که در سلولهای مرده این واکنش صورت نمی گیرد. جذب نوری (Optical Density=OD) این کریستال ها بعد از حل کردن در DMSO (dimethylsulfoxide) با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر در مقایسه با گروه های کنترل قرائت می شود. این نوع اندازه گیری در محیط برون تنی و در پلیت های سلولی ۹۶ چاهکی کشت سلولی قابل انجام می باشد. در این آزمایش می توان کریستال های فورمازان را با حلال های مختلف حل نمود و مقدار جذب نوری آن را با استفاده از دستگاههای کالریمتر در دو طول موج ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر به صورت

کمی اندازه گیری کرد. مقدار OD مربوط به سلول های در معرض دارو نسبت به مقدار آن در سلول های مواجهه نشده با دارو نشانه ی نسبت زنده بودن سلول ها در محیط حاوی دارو است. تهیه سریالی از غلظت دارو در چاهک ها و ارزیابی مقادیر زنده بودن سلول نسبت به گروه کنترل و پیاده کردن این مقادیر بر روی نمودار در بدست آوردن استاندارد ی به نام EC_{50} (Effective Concentration) یعنی غلظتی از ماده که باعث جلوگیری از رشد نیمی از ارگانیسم های مربوطه می گردد، استفاده می شود. در مورد سلول های غیر قابل رشد و تقسیم از استاندارد دیگری به نام LD_{50} (Lethal dose) یعنی غلظتی از ماده که باعث مرگ از نیمی از ارگانیسم های مربوطه می گردد استفاده می شود.

فصل دوم

بیان مسئله

اهداف و فرضیات

مرور متون

بیان مسئله:

داروهای سنتتیک علیرغم کارایی فوق العاده در درمان بسیاری از بیماری ها، دربرخی موارد با محدودیت هایی همراه هستند. به همین جهت امروزه پژوهش بر روی گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها به طور روزافزون رویکرد جهانی دارد و استفاده از گیاه درمانی و داروهایی با منشا گیاهی در سالهای اخیر روبه فزونی است، در همین راستا با توجه به تنوع آب و هوایی و در نتیجه فلور گیاهی بسیار متنوع در ایران امکان شناسایی مواد موثر گیاهی در گیاهان مختلف بومی کشور و استخراج آنها به منظور تولید این مواد به مقدار زیاد و در سطح صنعتی وجود دارد، این کار به ویژه در مورد گیاهانی که منحصر به ایران هستند و تاکنون کمتر مورد بررسی قرار گرفته اند، اهمیت ویژه ای دارد.

برآورد شده است که در حال حاضر حدود ثلث تا نیمی از فراورده های دارویی موجود در امریکا دارای منشا گیاهی است (۲۹). این استفاده گسترده می تواند به دلایل مختلفی چون کمتر بودن عوارض جانبی، پذیرش بهتر بیمار به علت توصیه طب سنتی، استفاده نسلهای گذشته، قیمت کمتر گیاهان دارویی و همچنین سازگاری با عملکرد فیزیولوژیک طبیعی بدن انسان باشد. گرایش به پژوهش بر روی گیاهان دارویی در ایران به طور قابل توجهی در دو سه دهه اخیر افزایش یافته است. این گرایش هم به شرایط اقلیمی مناسب کشور برای تکثیر و پرورش انواع گیاهان دارویی و هم پیشینه تاریخی طب سنتی در ایران مربوط می شود. تلاش هایی هم که در این زمینه در سال های اخیر در کشور انجام شده است به تولید فراورده های دارویی منتهی شده است که امروزه فرم تجاری آنها قابل عرضه در داروخانه های کشور می

باشد. داروهای گیاهی عمدتاً برای بیماری‌هایی استفاده می‌شود که استفاده از داروهای سنتتیک با محدودیت‌هایی روبروست. یکی از بیماری‌هایی که درمان آنها با محدودیت‌ها و چالش‌هایی همراه است، توکسوپلاسموز می‌باشد.

اهداف و فرضیات :

الف-هدف اصلی (*General Objective*)

تعیین EC50 عصاره‌های گیاهان زنیان، افسنطین، چای کوهی، بومادران و غوزه پنبه در مهارتوکسوپلاسمما در *Invitro*.

ب-اهداف فرعی (*Specific Objective*)

تعیین EC50 عصاره‌های گیاهان زنیان، افسنطین، چای کوهی، غوزه پنبه و بومادران در مهارتوکسوپلاسمما در *Invitro* بر حسب دوز .

تعیین EC50 عصاره‌های گیاهان زنیان، افسنطین، چای کوهی، غوزه پنبه و بومادران در مهارتوکسوپلاسمما در *Invitro* بر حسب مدت زمان بقای موش‌ها .

ج-اهداف کاربردی (*Applied Objectives*):

ارزیابی اولیه اثر ضد توکسوپلاسمایی انواع گیاهان دارویی به منظور شناسایی خواص ضد انگلی آنها و نهایتاً بررسی و یافتن مواد موثر آنها در فراکشن‌ها جهت استفاده به عنوان مواد طبیعی موثر با عوارض جانبی کمتر در پیشگیری یا درمان توکسوپلاسموز.

د-فرضیه‌ها (*Hypothesis*) یا سؤال‌های پژوهش:

عصاره‌های گیاهی سبب مهارتکثیر تاکی‌زوئیت‌ها در کشت سلولی می‌شوند.

مرور متون:

مطالعات انجام شده در ایران: در مطالعه شهابی و همکاران (۱۳۸۷)، عصاره هیدروالکلی و اسانس خوراکی گیاه زنیان بر کیست های ژياردی در محیط کشت آزمایشگاهی اثر کشندگی داشت (۳۸). ناطق پور و همکاران (۱۳۸۷) نشان دادند که عصاره الکلی گلدر به طور معنی دار سبب کاهش میزان پارازیتی پلاسمودیوم برگئی در موشها می شود (۳۹). در مطالعه براتی و همکاران (۱۳۸۹) عصاره های گیاهی آویشن شیرازی، اسپند و مورد به صورت برون تنی اثرات ضد لیشمانیایی (مهار پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور) خوبی داشتند (۴۰). سرشتی و همکاران (۱۳۹۰) نشان دادند که عصاره آبی و اتانولی چای کوهی تا حدودی اثر مهار کنندگی بر روی انگل تریکوموناس واژینالیس داشت (۴۲). در مطالعه خلیلی دهکردی و همکاران (۱۳۹۰) عصاره گیاهان افسنطین، بومادران و برگ گردو به طور معنی دار سبب کاهش تعداد تریکوموناس در محیط کشت شد (۲۹). در مطالعه سوزنگر و همکاران (۱۳۹۱) عصاره گیاهان ابوخلسا و بومادران سبب کاهش تعداد انگل در محیط کشت شد (۴۴). در مطالعه دیگر براتی و همکاران (۱۳۸۹) نشان داده شد که عصاره های گیاهی درمنه کوهی در مقایسه با تارتامتیک (داروی کنترل) تنها در غلظت بالا اثر ضد لیشمانیایی خوبی داشت. همچنین، غوزه پنبه اثرات ضد لیشمانیایی مطلوبی از خود نشان داد (۴۱).

در مطالعه محرابی و همکاران (۱۳۹۱) بررسی مداخله ای اثر دارویی گیاه ذغال اخته، سیر و ترکیبی از هر دو بر روی اوو سیست های کریپتوسپوریديوم در محیط هنکس انجام شد. در این مطالعه سیر، ذغال اخته و مخلوط این دو گیاه با توجه به افزایش غلظت و مدت اثر آنها،

کاهش قابل ملاحظه ای در تعداد انگل ها نشان دادند (Unlu, ۴۳) و همکاران (۲۰۱۰) اثر اسانس پوست گیاه دارچین را روی ۲۱ گونه باکتری و گونه کاندیدا بررسی و اثرات ضد باکتری و ضد قارچی قوی گیاه را به دلیل وجود درصد بالای ترکیب سینام آلدئید گزارش کردن (۴۵).

عطائی و همکاران (۱۳۸۶) اثر ضد قارچی عصاره چند گیاه از جمله دارچین را در مقایسه با نیستاتین به صورت دهان شویه روی سوش استاندارد کاندیدا آلبیکانس بررسی کردند و اثرات ضد قارچی مناسبی برای آنها گزارش کردند (۴۶). در مطالعه جعفری و همکاران (۱۳۹۱) خواص ضد باکتریایی بخشهای مختلف گیاه گزنه دو پایه مشخص شد (۴۷).

مطالعات انجام شده در سایر کشورها: مطالعات فراوانی در زمینه اثرات عصاره ها و فراکشن های گیاهی در سایر کشورها بر روی انواع تک یاخته ها انجام شده است. به طور مثال، در مطالعه ای که توسط آستولا و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شد، عصاره الکلی دانه های اسپند در محیط کشت دارای اثر مهار کنندگی بر پلاسمودیوم فالسی پاروم بود (۴۸). در مطالعه Patricia و همکاران (۲۰۰۵) در برزیل اثرات ضد لیشمانیایی ۱۹ عصاره گیاهی از جمله بومادران و فلفل بر روی انگل لیشمانیا آمازونینسیس و تریپانوزوما کروزو به صورت *in vitro* ارزیابی شد. درصد مهار رشد عصاره این گیاهان از ۴۹/۵٪ تا ۹۹٪ متفاوت بود و هیچ اثر سایتوتوکسیتی روی گلبول های قرمز نشان نداد (۴۹). در سال ۲۰۱۱، Tariku و همکاران گزارش کردند که افسنتین در غلظت های مناسب دارای خاصیت قوی ضد لیشمانیایی است (۵۰).

مطالعات انجام شده در مورد اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها و فراکشن های گیاهی: با جستجو در بانک های اطلاعاتی قابل دسترس به ویژه Pubmed تعداد محدودی مطالعه در مورد اثر ضد توکسوپلاسمایی فراورده های گیاهان دارویی بدست آمد که به نتایج آنها در زیر اشاره می شود:

مطالعه خوش زبان و همکاران (۱۳۸۶) تنها گزارشی است که در ایران انجام شد و در یکی از مجلات پژوهشی فارسی چاپ شد. در این مطالعه موش های BALB/c متعاقب تلقیح داخل صفاقی سویه RH تحت تجویز خوراکی عصاره سیر قرار گرفتند. عصاره سیر باعث افزایش بقاء موش ها و کاهش فراوانی انگل در بافتهای آنها شد. مؤثرترین دوز از نظر افزایش زمان بقاء، ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی سیر بود (۵۱).

در مطالعه Youn و همکاران (۲۰۰۳) فعالیت ضد توکسوپلاسمایی ۵ عصاره الکلی گیاهی شامل: تلخ بیان (*Sophora flavescens*)، سینومنیوم (*Sinomenium acutum*) ، بادلرزان (*Pulsatilla koreana*)، هویج تیغی (*Torilis japonica*) و نارون (*Ulmus macrocarpa*) بر تاکی زوئیت های توکسوپلاسمما گوندی ای و نئوسپورا کانینوم در مقایسه با سولفادیازین در محیط کشت سلولی ارزیابی شد که نشان داد به طور کلی عصاره های T. Japonica و S. flavescence مهار کننده بهتری برای هر دو انگل هستند. میزان کاهش تکثیر انگل های مجاورت داده شده با غلظت های ۵/۳۱۲، ۳/۱۵۶ و ۱/۷۸ نانوگرم به ازای هر حفره عصاره T. Japonica در مقایسه با کنترل ها به ترتیب ۹۹/۷، ۹۸ و ۸۰/۸٪ بود. این درصدهای مهار برای عصاره S. Flavescence به ترتیب ۹۸/۵، ۷۱/۷ و ۷۰/۸ بود (۵۲).

در مطالعه Jones-Brando و همکاران (۲۰۰۶) اثر مهاری چهار مشتق جدید آرتیمی سینین درمنه (Artemisinin) بر توکسوپلازما در *in vitro* بررسی شد. در این مطالعه میانگین دوز مهاری (inhibitory dose= ID50) و میانگین دوز توکسیک Toxic dose= (TD50) برای هر یک از ترکیبات بدست آمد. سه تا از ترکیبات آرتیمی سینین در غلظت کمتر از 1 µg/ml و چهارمی در غلظت بین ۲ و ۳ میکروگرم در میلی لیتر توکسوپلازما را مهار کرد. مقدار آن برای تری متوپریم ۵/۲ µg/ml بود. ترکیبات آرتیمی سینین توکسیسیتی کمتری از تری متوپریم داشتند، به طوری که مشتقات آرتیمی سینین تنها در غلظت های بالاتر از ۱۶۰ µg/ml سیتوتوکسیسیتی نشان دادند و حال آنکه TD50 تری متوپریم معادل ۱۶۰ µg/ml بود (۵۳).

در مطالعه Al-Zanbagi و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت ضد توکسوپلاسمائی عصاره مر (Myrrh) در مقایسه با اسپیرامایسین در *in vivo* ارزیابی شد. موش ها پس از تلقیح داخل صفاقی 2×10^2 تاکی زوئیت از همان روز تحت تجویز روزانه ۱۰۰ mg/kg عصاره قرار گرفتند. در پایان چهارمین روز پس از تلقیح، تاکی زوئیت ها از حفره صفاقی موش های تحت تجویز عصاره، موش های تحت تجویز اسپیرامایسین و موش های کنترل پونکسیون و شمارش شد. عصاره Myrrh اثر مهاری قویتری از اسپیرامایسین نشان داد (۵۴). در مطالعه Choi و همکاران (۲۰۰۸)، فعالیت ضد توکسوپلاسمایی عصاره های متانولی ۱۵ گیاه دارویی بر تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلازما در محیط کشت سلولی Hella در مقایسه با پریمتامین بررسی شد. در این مطالعه عصاره های شیرین بیان (Glycyrrhiza glabra L.)،

اگیر ترکی (Acorus gramineus Soland) و سرخس نر (Dryopteris crassirhizoma) بیشترین فعالیت ضد توکسوپلاسمایی داشتند ($EC_{50}=0.11-0.15$ mg/ml) اما توکسیسیته انتخابی نداشتند ($Selectivity=1.7-2.5$). Sophora flavescens Aiton فعالیت ضد توکسوپلاسمایی ($EC_{50}= 0.20$ mg/ml) و توکسیسیته انتخابی بالایی ($Selectivity=4.6$) نشان داد. همچنین، Zingiber officinale (زنجبیل) دارای فعالیت بالای ضد توکسوپلاسمایی ($EC_{50}= 0.18$ mg/ml) بود و سیتوتوکسیسیته آن در مقابل سلول های HeLa ($EC_{50}= 1.81$ mg/ml) بود. زنجبیل فعالیت قوی ضد توکسوپلاسمایی ($Selectivity=10.1$) نسبت به پریمتامین ($Selectivity=2.1$) و اسپیرامایسین ($Selectivity=2.5$) نشان داد (۵۵). در مطالعه Jiang و همکاران (۲۰۰۸)، اثر ضد توکسوپلاسمایی اولئورپین یا زیتون (Oleuropein) جدا شده از گیاه زبان گنجشک (Fraxinus rhychophylla) در مقایسه با داروهای سولفادیازین و پریمتامین در شرایط *in vitro* و *in vivo* ارزیابی شد. اولئورپین در *in vitro* اثر ضد توکسوپلاسمایی خوبی نشان داد. به طوری که selectivity اولئورپین (۸/۹) از سولفادیازین (۳/۸) و پریمتامین (۲/۵) بیشتر بود. در *in vivo* میزان مهار تکثیر توکسوپلاسمای در صفاق موش های تحت تجویز اولئورپین (۵۵/۴٪) از موش های تحت تجویز سولفادیازین (۸۵/۳٪) کمتر و با موش های تحت تجویز پریمتامین تقریباً یکسان بود (۵۶). در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت ضد توکسوپلاسمایی عصاره اتری جینکو Ginkgo biloba sarcotestas به نام GAS(ginkgolic acid) در *in vitro* در محیط کشت سلولی human foreskin

fibroblast (HFF) ارزیابی شد. اثر GAS در مقایسه با آزیترومایسین در غلظت های ۳/۱۳ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بررسی شد. در این مطالعه غلظت ایمن آزیترومایسین (میزان تکثیر ۹۰٪) برای ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون به ترتیب ۱۶۷/۱ و ۱۱۵/۲ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. توکسیسیته GAS برای سلول های HFF کمتر از آزیترومایسین بود. به طوری که غلظت GAS برای میزان تکثیر ۹۰٪ بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون به ترتیب غلظت های ۱۷۲ و ۱۵۴/۶ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. در این مطالعه از $[^3\text{H}]\text{-Leu}$ و $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ برای ارزیابی DNA توکسوپلازما و سنتز پروتئین استفاده شد. GAS قادر بود در تمامی غلظت ها هم سنتز DNA و هم سنتز پروتئین توکسوپلازما را در روش وابسته به زمان مهار کند (۵۷).

در مطالعه De Oliveira و همکاران (۲۰۰۹) اثر دم کرده درمنه خزری یا گیاه گندواش *Artemisia annua* L. روی حساسیت به عفونت توکسوپلازما در مدل تجربی *in vitro* و *in vivo* ارزیابی شد. در این مطالعه از سلول های HFF برای کشت سلولی استفاده شد. تاکی زوئیت ها به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه و ۵٪ CO_2 با رقت های سریال دو برابر دم کرده *A. annua*، (۸۰-۲۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$) یا سولفادیازی (۱/۵۶-۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$) و یا محیط کشت تنها (کنترل) با سلول های مونولایر روی لامل ها انکوبه شدند. در تجربه دیگری، مجاورت پس از ۳ ساعت از آلودگی سلول ها با تاکی زوئیت ها تکرار شد. نتایج به صورت درصد مهار عفونت و تکثیر داخل سلولی انگل برای هر مجاورت نسبت به کنترل بیان شد. میانگین غلظت مهاری (EC50) محاسبه شد. بر اساس نتایج این مطالعه، ویابلیتی سلول های HFF در

غلظت های مختلف دم کرده *A. annua* و سولفادیازین، بالای ۷۲٪ بود. مجاورت تاکی زوئیت ها با *A. annua* قبل از عفونت در سلول های HFF منحنی مهاری dose-response نشان داد که به ۷۵٪ مهار رسید که مشابه نتایج بدست آمده با سولفادیازین بود. در تجارب *in vivo* دم کرده *A. annua* کنترل موثری بر سویه کیست ساز توکسوپلازما (ME-49) نشان داد. منحنی بقاء موش های آلوده شده با سویه RH بین موش های تحت تجربه با دم کرده *A. annua* و موش های تحت تجربه با سولفادیازین اختلاف معنی دار نداشت (۵۸). در مطالعه Kavitha و همکاران (۲۰۱۲) اثر ضد توکسوپلاسمایی چهار فراکشن عصاره ریشه گیاه *Eurycoma longifolia* jack در کشت سلولی Vero cells مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه از سویه RH توکسوپلازما و غلظت های نهایی ۱۰۰-۱/۵۶ میکروگرم در میلی لیتر فراکشن ها و کلیندامایسین استفاده شد و میانگین غلظت موثره (Effective Concentration=EC50) تعیین گردید. بر اساس نتایج این مطالعه، همه نمونه ها اثر کشندگی بر توکسوپلازما داشتند و بیشترین اثر کشندگی مربوط به فراکشن TAF355 بود. EC50 برای کلیندامایسین، ۰/۰۱۶ و برای TAF 355، ۰/۳۶۹ بود. همچنین، اثر مهار کنندگی فراکشن های TAF 355 و TAF 401 با افزایش غلظت، افزایش نشان داد (۵۹).

فصل سوم

مواد و روش ها

۱-۳: تهیه گیاهان مورد مطالعه و شناسایی آنها: در این مطالعه، اثرات ضد توکسوپلاسمایی

عصاره گیاهان زنیان، افسنطین، چای کوهی، بومادران و غوزه پنبه بر تاکی زوئیت های توکسوپلاسم در محیط *in vitro* و کشت سلول مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهان مورد مطالعه توسط متخصص گیاه شناسی جمع آوری و شناسایی شدند و یک نمونه از هر گیاه در پژوهشکده گیاهان دارویی ثبت و نگهداری شد.

۲-۳: تهیه عصاره: عصاره گیری تحت نظارت متخصص فارماکونوزی انجام شد. به طور خلاصه، پس از خشک کردن و آسیاب کردن گیاهان، نیم کیلوگرم از آنها ابتدا توسط اتانول و به وسیله دستگاه پرکولاتور عصاره گیری شد. این عمل برای سه بار تکرار گردید و سپس عصاره های حاصل بوسیله دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ شدند. میزان عصاره خشک محاسبه و با انجام آزمایش های مقدماتی، به کمک حلال دی متیل سولفاکساید (Dimethyl

sulfoxide=DMSO) غلظت های متفاوت از گیاهان تهیه شد

۳-۳: تهیه و نگهداری سویه توکسوپلاسم گوندی ای: در مطالعه حاضر از سویه RH

توکسوپلاسم گوندی ای استفاده شد. این سویه به طور دوستانه از گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه گردید و در آزمایشگاه از طریق پاساژ های داخل صفاقی در موش های سوری تکثیر و نگه داری شد.

۴-۳: ارزیابی اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی: اثرات ضد توکسوپلاسمایی

عصاره ها در شرایط برون تنی عاری از سلول و در کشت سلولی انجام شد:

۱-۳-۴. اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در شرایط برون تنی عاری از

سلول

در مطالعه حاضر تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلازما گوندی ای در داخل میکروتیوپ با عصاره اتانولی ۵ گیاه زنیان، افسنطین، چای کوهی، بومادران و غوزه پنبه مجاورت داده شدند و اثر کشندگی آنها بر انگل ارزیابی شد.

۲-۳-۴: تهیه و آماده سازی عصاره های گیاهی:

مواد و وسایل مورد نیاز: عصاره اتانولی گیاه،

ظرف شیشه ای اپلیکاتور، (قاشقک) فلزی، شعله،

DMSO، ترازوی دیجیتال، آب مقطر.

۳-۳-۴: تهیه غلظت های مختلف از عصاره ها:

از هر یک از عصاره ها غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ میلی گرم/میلی لیتر به روش زیر تهیه

شد. یک گرم از هر عصاره را با ترازو وزن کرده و در ظرف شیشه ای ریخته سپس توسط

قاشقک فلزی در کنار شعله با اضافه کردن تدریجی یک میلی لیتر DMSO %۱۰ در PBS

PH 7.2. 0.15 M کاملاً حل گردید (1000mg/ml). این غلظت از عصاره به عنوان

ذخیره (Stock) در دمای ۴ درجه نگهداری شد. از این غلظت ذخیره، با استفاده از PBS

غلظت های فوق تهیه شد.

۴-۳-۴: تکثیر و آماده سازی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای:

مواد و وسایل مورد نیاز: سرنگ انسولین، سرنگ معمولی در اندازه های دو، ده و بیست و پنج میلی لیتری، گازاستریل، ماسک، دستکش لاتکس، دستکش یکبار مصرف، لام، لامل، لام نئوبار، پیت پاستور، پیت های شیشه ای، لوله فالكون ۱۵ و ۵۰ میلی لیتری. در هر بار برای تکثیر و جمع آوری تاکی زوئیت ها، حدود 10^6 تاکی زوئیت تازه به طریق داخل صفاقی به ۴-۳ موش تلقیح شد. حدود ۷۲ ساعت بعد از تلقیح، تاکی زوئیت های تکثیر یافته در صفاق موش ها از طریق شستشوی حفره صفاقی با سرم فیزیولوژی جمع آوری شدند. تاکی زوئیت های جمع آوری شده به داخل لوله سانتریفیوژ استریل منتقل و سه با استفاده از (Phosphate buffer saline) PBS شستشو شدند. در مرحله بعد به منظور بالا بردن درصد خلوص تاکی زوئیت ها و خارج کردن سلول های صفاقی، سوسپانسیونی از رسوب تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه با دور 200g سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی به لوله دیگری منتقل و با دور 1000g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل از سانتریفیوژ PBS اضافه شد و مجدداً سوسپانسیون یکنواختی تهیه شد. تعداد تاکی زوئیت ها در سوسپانسیون با استفاده از لام نئوبار شمارش شد و با استفاده از PBS سوسپانسیون حاوی 10^7 تاکی زوئیت در میلی لیتر تهیه شد. از این سوسپانسیون برای ارزیابی اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها در شرایط برون تنی عاری از دودمان سلولی استفاده شد.

۵-۴-۳. تهیه و آماده سازی رنگ متیلن بلو قلیایی: این رنگ بر اساس پروتکل ارائه شده

توسط جانسون و هولیمن (۶۱) تهیه شد:

مواد مورد نیاز: پودر تترابورات سدیم، پودر کربنات سدیم، پودر متیلن بلو، الکل اتیلیک مطلق،

آب دیونیزه، بالن، ترازو دیجیتال، PH متر، کاغذ صافی،

روش تهیه رنگ متیلن بلو:

مقدار ۰/۰۲۸ گرم از پودر تترابورات سدیم به همراه حدود ۰/۲۵ گرم پودر کربنات سدیم در

بالن ریخته و با اضافه کردن تدریجی ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه پودرها کاملاً حل شد. در

مرحله بعد مقدار ۰/۰۳۲ گرم از پودر متیلن بلو در ۲ میلی لیتر الکل اتیلیک مطلق حل و پس

از عبور از کاغذ صافی، با محلول فوق به خوبی مخلوط شد. سپس PH این محلول با PH

متر سنجیده شد و روی PH=11 تنظیم شد. محلول فوق در ظرف تیره پوشانده شده با فویل

ریخته و در یخچال نگهداری شد.

۶-۴-۳. مجاورت عصاره های گیاهی با تاکی زوئیت ها و تعیین درصد مرگ سلولی:

مواد و وسایل مورد نیاز: سمپلر و سر سمپلر در اندازه های مختلف، میکروتیوپ، ساعت،

لام، لامل، رنگ متیلن بلو، میکروسکوپ.

روش اجرا: در این مرحله ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تاکی زوئیت ها با ۵۰ میکرو لیتر از

غلظت های مختلف عصاره ها در داخل میکروتیوپ در دمای آزمایشگاه مجاورت داده شد. هر

یک از غلظت ها به طور جداگانه در مدت زمان های ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه با تاکی زوئیت ها

مجاورت داده شدند. در پایان هر زمان انکوباسیون، ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون تاکی زوئیت

ها پس از مخلوط کردن به سطح لام منتقل و با افزودن ۵ میکرولیتر رنگ آبی متیلن مخلوط

گردید و با لامل پوشانده شد. بعد از ۳-۲ دقیقه میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها تعیین شد.

بدین ترتیب که حدود ۲۵۰-۳۰۰ تاکی زوئیت با درشتنمایی $\times 400$ شمارش و نسبت تعداد تاکی زوئیت های کشته شده (رنگ نگرفته) به تعداد کل تاکی زوئیت ها برای هر یک از عصاره ها در غلظت ها و زمان های مختلف انکوباسیون برآورد شد. از سوسپانسیون تاکی زوئیت ها در PBS و سوسپانسیون تاکی زوئیت ها در DMSO به عنوان کنترل استفاده شد. تمامی تجارب به صورت سه گانه انجام و سه بار تکرار شد و میانگین و انحراف معیار برای هر مورد تعیین گردید.

۷-۴-۳. زیست سنجی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با عصاره ها در موش:

از روش زیست سنجی در موش برای تایید ۱۰۰٪ اثر کشندگی عصاره ها بر تاکی زوئیت ها استفاده شد. در این مطالعه، حداقل غلظتی از هر عصاره که در کمترین مدت زمان انکوباسیون، ۱۰۰٪ اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها داشت، به این روش مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور به سه موش و هر کدام ۵۰ میکرولیتر از نمونه مجاورت داده شده با عصاره به طریق داخل صفاقی تزریق شدن. موش ها تا یک ماه روزانه تحت نظر قرار گرفتند تا اگر کز کردند و تحرکشان به طور قابل توجهی کاسته شد، از نظر تاکی زوئیت ها در مایع صفاقی بررسی شوند. همزمان به موش کنترل، تاکی زوئیت های بدون مجاورت با عصاره تلقیح شد.

۵-۳. اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در کشت سلولی:

۱-۵-۳: دودمان سلولی مورد استفاده، تهیه، تکثیر و نگهداری آن:

تهیه دودمان سلولی: در این مطالعه برای ارزیابی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها بر تاکی زوئیت ها در کشت سلولی از سلول های HeLa استفاده شد. این سلول ها از انستیتو پاستور

ایران خریداری و با استفاده از فلاسک ۲۵ میلی لیتری حاوی مواد مغذی به دانشگاه علوم پزشکی قزوین منتقل شدند.

تکثیر و نگهداری دودمان سلولی:

مواد و وسایل مورد نیاز: سرنگ انسولین، سرنگ معمولی در اندازه های دو، پنج و ده میلی لیتری، گازاستریل، ماسک، دستکش لاتکس و دستکش یکبار مصرف، لام، لامل، لام نئوبار، پیپت پاستور، پیپت های شیشه ای، لوله فالكون ۱۵ و ۵۰ میلی لیتری، ظروف شیشه ای آزمایشگاهی مانند بالن ژوژه، پتريدیش، استوانه مدرج، ارلن، بشر، سمپلر و سر سمپلر در اندازه های مختلف، میکروپلیت ۹۶ خانه ای ته صاف.

۳-۵-۲: محلول های مورد نیاز:

بافر فسفات سالین (PBS)

از این بافر برای شستشوی سلولها و تهیه برخی از محلولها استفاده گردید. برای تهیه این بافر مقادیر زیر با ترازوی دیجیتال وزن کرده و به تدریج با افزودن آب مقطر دیونیزه تا حجم ۹۵۰ حل کرده و پس از تنظیم نمودن pH (۷/۲-۷/۴) با سود یا اسید کلریدریک ۱ نرمال، محلول به حجم یک لیتر رسانده شد.

KCl (Merck)	۰/۲ گرم
NaCl(Merck	۸ گرم

(12H ₂ O) Na ₂ HPO ₄	۱/۱۵ گرم
KH ₂ PO ₄ (Merck)	۰/۲ گرم

L – گلوتامین (۲ میلی مولار): ۰/۶ گرم از پودر ال- گلوتامین داخل ارلن با ۲۰ سی سی PBS کاملاً حل گردید و مایع شفاف حاصل شد. سپس در زیر هود توسط فیلتر سر سرنگی استریل و در میکروتیوپ های استریل در حجم های ۱ میلی لیتر تقسیم و در ۲۰- نگهداری شد (برای هر ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت، ۰/۵ میلی لیتر ال- گلوتامین استفاده شد)

پن استرپ: به صورت تجاری و آماده با دوز ۱۰۰۰۰ واحد از شرکت Gipro آلمان خریداری شد. به ازاء هر ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت، مقدار ۵۰ میکرولیتر پن استریپ استفاده شد.

محلول رنگ آمیزی تریپان بلو: این رنگ جهت تعیین درصد حیات سلول های جدا شده مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه رنگ به ترتیب زیر عمل شد:

تریپان بلو	۰/۰۴ گرم
بافر فسفات سالین	۱۰ میلی لیتر

در این روش سوسپانسیون سلولی به نسبت ۱:۱ با محلول رنگ مخلوط و در عرض ۵-۱۰ دقیقه زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ درصد سلول های رنگ نگرفته (زنده) شمارش شدند. جهت تهیه این محلول مقادیر زیر تهیه و سپس فیلتر شد.

تهیه محیط مغزی برای کشت سلول: در یک فالكون استریل در زیر هود ۴۵ میلی لیتر RPMI 1640 ریخته و سپس ۵ میلی لیتر FBS به آن اضافه شد. سپس ۱ میلی لیتر ال گلوتامین و ۲۵۰ میکرولیتر پن استرپ به آن اضافه گردید. درب فالكون را بسته و با پارافیلیم کاملاً پوشانده شد تا مانع تبخیر شود. از این محیط برای پاساز سلول ها و تعویض محیط کشت سلولی استفاده شد. این محیط در ۴ درجه نگهداری شد.

شمارش سلول های هلا و تعیین ویابلیتی سلول ها: پس از تریپسینه کردن فلاسک کشت، سوسپانسیون سلولی ۲ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب ته فالكون با پیپت پاستور به آرامی پیپتاژ شد تا یک سوسپانسیون یک دست از سلول های هلا بدست آید و سلول ها آسیب نینند. در مرحله بعد، ۱۰ μ l از سوسپانسیون سلولی همراه با ۱۰ μ l از محلول رنگ آمیزی تریپان بلو ۰.۴٪ داخل میکروتیوپ استریل اضافه کرده و به آرامی با هم مخلوط شدند. برای تعیین درصد ویابلیتی، تعداد سلول های مرده (رنگ گرفته) و سلول زنده (رنگ گرفته) با استفاده از لام نئوبار در خانه های WBC شمارش و با استفاده از فرمول زیر درصد ویابلیتی (viability) سلول ها تعیین شد. پس از شمارش سلولی با استفاده از RPMI1640، رقتی از سلول ها تهیه شد که در هر ۱۰۰ میکرولیتر آن حاوی ۶۰۰۰۰ سلول بود.

فرمول شمارش سلول های Hela

حجم سوسپانسیون $\times 10^4 \times 2 \times$ (ضریب رقت) \times تعداد سلوها در مربع ۱۶ تایی = تعداد کل سلول ها

فرمول محاسبه Viability

$Viability = [سلول های زنده و مرده (کل سلول ها) / تعداد سلول های زنده] \times 100$

۳-۵-۳: آماده سازی تاکي زوئیت ها:

تاکي زوئیت های تکثیر یافته در موش ها (مطابق روش ۳-۴-۴) بعد از ۷۲ ساعت جمع آوری شدند. سپس پونکسیون صفاقي با PBS استریل با $PH=7.2$ ۰/۱۵ مولار تاکي زوئیت ها را جمع آوری نموده در لوله ریخته و ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰ g سانتریفیوژ کردیم و سپس قسمت رویی را برداشته و در لوله دیگر ریخته و در دور ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی را دور ریخته و به رسوب، RPMI1640 بدون FBS اضافه شد و زنده بودن انگل ها با تست تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس توسط لام نئوبار تعداد انگل ها را محاسبه کرده و با دادن رقت با PBS تعداد مورد نیاز انجام آزمایش که $10^4 \times 1$ بود را بدست آمد.

برای محاسبه و شمارش بر روی لام نئوبار از ۴ خانه اطراف لام نئوبار که محل شمارش WBC است استفاده شد.

۳-۵-۴: آماده سازی عصاره ها برای مجاورت با تاکي زوئیت ها در کشت سلولی:

تهیه غلظت ذخیره (stock): مقدار 0.2 gr (20 mg میلی گرم) هر عصاره با اضافه کردن تدریجی یک میلی لیتر RPMI و 1% DMSO کاملاً حل گردید و تا زمان استفاده در دمای 4°C درجه سانتی گراد نگهداری شد. این به عنوان STOCK اولیه ما بود.

تهیه غلظت های کار: غلظت های ($50-100-200-400 \text{ } \mu\text{g/ml}$) را با دادن رقت توسط RPMI به استوک اولیه تهیه کردیم. غلظت ما در اینجا به صورت زیر محاسبه می شود. $0.2 \text{ g/ml} = 20 \text{ mg/ml} = 20/1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$. نمونه استوک را با دادن رقت ۱ به ۲۰، به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تبدیل شده و سایر غلظت ها را با غلظت ۱۰۰۰ آماده کردیم. غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه همراه، با ۸۰۰ میکرولیتر RPMI. غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه، همراه با ۹۰۰ میکرولیتر با RPMI. غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر، ۵۰ میکرولیتر از نمونه همراه، با ۹۵۰ میکرولیتر با RPMI. (غلظت های مختلف عصاره ها در کشت سلول بر حسب میکروگرم در میلی لیتر).

۵-۳. تهیه و آماده سازی داروی پریمتامین:

داروی پریمتامین به صورت پودر خشک ۲۵۰ میکروگرمی از تولیدات شرکت Sigma-Aldrich با خلوص ۹۸ درصد تهیه شد. دارو در یک میلی لیتر اتانول-استن به نسبت ۱:۱ حل و آماده سازی شد. بدین ترتیب که ابتدا به پودر ۵۰۰ میکرولیتر اتانول خالص (Merck) افزوده و حل شد و سپس ۵۰۰ میکرولیتر استن (Merck) به آن افزوده شد تا کاملاً حل

شود. غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ مقدار 0.01 mg از دارو را در 200 میکرو لیتر از حلال حل کرده و

200 میکرو لیتر آن دارای غلظت 10 میکرو گرم در میلی لیتر می باشد.

غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ مقدار $10 \mu\text{g}$ از دارو را در 2 میلی لیتر از حلال حل کرده و 200 میکرو لیتر

آن دارای غلظت 1 میکرو گرم در میلی لیتر می باشد. غلظت $0.1 \mu\text{g/ml}$ مقدار $10 \mu\text{g}$ از

دارو را در 20 میلی لیتر از حلال حل کرده و 200 میکرو لیتر آن دارای غلظت 1 میکرو گرم در

میلی لیتر می باشد. غلظت $0.01 \mu\text{g/ml}$ مقدار $1 \mu\text{g}$ از دارو را در 20 میلی لیتر از

حلال حل کرده و 200 میکرو لیتر آن دارای غلظت 0.01 میکرو گرم در میلی لیتر می باشد.

۳-۵-۶. مجاورت عصاره های گیاهی و داروی پریمتامین با تاکی زوئیت ها:

$100 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون سلول های هلا به هر چاهک در میکرو پلایت های 96 خانه ای

مخصوص کشت سلول اضافه شد (یعنی $60,000$ سلول به ازای هر چاهک). پلیتهای

کشت شده به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37°C تحت شرایط $5\% \text{ CO}_2$ قرار گرفتند.

در روز بعد، سلول های هلا از نظر چسبندگی و زنده بودن با میکروسکوپ اینورت

بررسی شدند. سپس 50 میکرو لیتر از سوسپانسیون تاکی زوئیت های تهیه شده به روش

۳-۴-۴ حاوی 3×10^5 تاکی زوئیت به هر چاهک اضافه شد (نسبت تاکی زوئیت به سلول

5 به 1 بود (۵۵ و ۵۹). پس از افزودن تاکی زوئیت ها، بلافاصله میکرو پلایت در انکوباتور

37°C درجه سانتی گراد و تحت شرایط $5\% \text{ CO}_2$ به مدت 6 ساعت قرار گرفت. بعد از

این مدت محیط رویی میکرو پلایت توسط مولتی سمپلر تخلیه و با افزودن 100 میکرو لیتر

محیط مغزی RPMI1640 جایگزین شد (این مرحله به منظور حذف تاکی زوئیت های

خارج سلولی انجام شد). سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور تحت شرایط فوق نگهداری شد. بعد از این مدت بر اساس چارت زیر غلظت های مختلف عصاره ها و دارو (به عنوان کنترل) به چاهک ها اضافه شد و دوباره انکوباسیون با شرایط فوق به مدت ۲۴ ساعت تکرار شد. بعد از خاتمه انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر از محلول کیت sigma MTT ایده زیست نو ترکیب (به هر چاهک افزوده شد و سپس به مدت ۴ ساعت در شرایط مشابه انکوبه شد (تا بلورهای فورمازان نمایان شوند).

چارت مجاورت تاکی زوئیت ها با غلظت های مختلف عصاره ها و دارو در کشت

سلول:

C1	C3	C5	C7	HTE1	HTE3	HE1	HE3				
C1	C3	C5	C7	HTE1	HTE3	HE1	HE3				
C1	C3	C5	C7	HTE1	HTE3	HE1	HE3				
C2	C4	C6	C8	HTE2	HTE4	HE2	HE4				
C2	C4	C6	C8	HTE2	HTE4	HE2	HE4				
C2	C4	C6	C8	HTE2	HTE4	HE2	HE4				

C1=Hela+RPMI 1640; C2=DMSO+Hela+RPMI 1640; C3=Hela+Tachyzoite+drug 10 µg/ml; C4=Tachyzoite+drug 1 µg/ml; C5=Tachyzoite+drug 0.1 µg/ml; C6=Tachyzoite+drug 0.01 µg/ml; C7=DMSO+Hela+RPMI; C8=DMSO+Hela+tachyzoite; HE 1= Hela+extract 400 µg/ml; HE 2= Hela+extract 200 µg/ml; HE 3= Hela+extract 100 µg/ml; HE 4= Hela+extract 50 µg/ml; HTE 1= Hela+tachyzoite+extract 400 µg/ml; HTE 2= Hela+tachyzoite+extract 200 µg/ml; HTE 3= Hela+tachyzoite+extract 100 µg/ml; HTE 4= Hela+tachyzoite+extract 50 µg/

۳-۵-۷. سنجش اثر سایتوتوکسیسیتی با روش MTT

مواد مورد نیاز: پودر MTT، بافر PBS، DMSO

طرز تهیه محلول MTT: ۲۵ میلی گرم پودر زرد رنگ MTT در ۵ میلی لیتر RPMI 1640 حل شد (۵ mg/ml). پس از حل شدن کامل پودر، محلول در زیر هود با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲µm فیلتر شد تا هم استریل شود و هم ذرات نامحلول احتمالی موجود در آن حذف شود. این محلول استریل در حجم‌های یک میلی لیتری تقسیم و در ظرف‌های مخصوص کیت در تاریکی و دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. در موقع نیاز، محلول از فریز خارج و در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا ذوب شود. لازم به ذکر است که تمام مراحل ساخت محلول مذکور و استریلیزاسیون آن در شرایط تاریکی و داخل هود انجام شد.

روش انجام آزمایش MTT: پس از خاتمه انکوباسیون نمونه‌ها با محلول MTT، به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از DMSO کیت افزوده و کاملاً با پیپت مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO₂ قرار داده شد. در نهایت دانسیته نوری (Optical Density=OD) نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر الایزا (Epoch, USA) در دو طول موج ۵۷۰ و ۶۳۰ قرائت شد.

با استفاده از OD های بدست آمده، Viability، EC50 و Selectivity محاسبه شد.

$$Viability = [\text{کل سلول ها} / \text{تعداد سلول های زنده}] \times 100$$

$$Selectivity = EC50 \text{ Hela cell} / EC50 \text{ Toxoplasma RH strain}$$

EC50= median effective concentration

تمامی تجارب به صورت سه گانه انجام و سه بار تکرار شد و میانگین و انحراف معیار برای هر مورد تعیین گردید.

اثر سایتوتوکسیک عصاره های تهیه شده بر روی سلول های سرطانی با روش رنگ سنجی، با استفاده از رنگ تترازولیوم با نام شیمیایی 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-dipheny Tetrazolium bromide که اختصاراً MTT نامیده می شود، در مقایسه با گروه های کنترل بررسی شد.

آنالیز آماری: علاوه بر آمار توصیفی از آزمون های ANOVA، توکی، کروسکال والیس و کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS-16 آنالیز شد و سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

فصل چہارم

نتائج

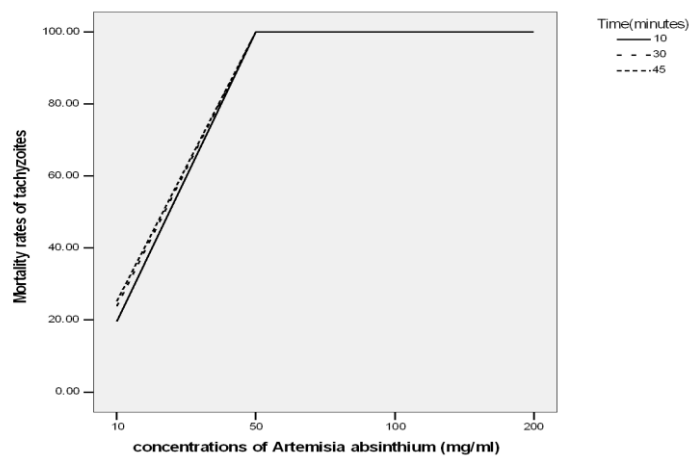
اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در شرایط برون تنی عاری از سلول

میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره افسنطین: عصاره افسنطین در غلظت های مختلف دارای اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها بود. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت های مختلف افسنطین در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. متوسط میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلاسمای گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه افسنطین در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت عصاره افسنطین (میلی گرم/میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون
۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	(دقیقه)
۱۹/۵۸±۴/۸۴	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰
۲۳/۸۴ ±۵/۲۷	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۳۰
۲۵/۱۹ ± ۶/۹۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۴۵

میزان کشندگی عصاره افسنطین در غلظت ۱۰ میلی گرم/ میلی لیتر با افزایش مدت زمان انکوباسیون ، افزایش معنی دار را نشان داد ($P<0.001$).



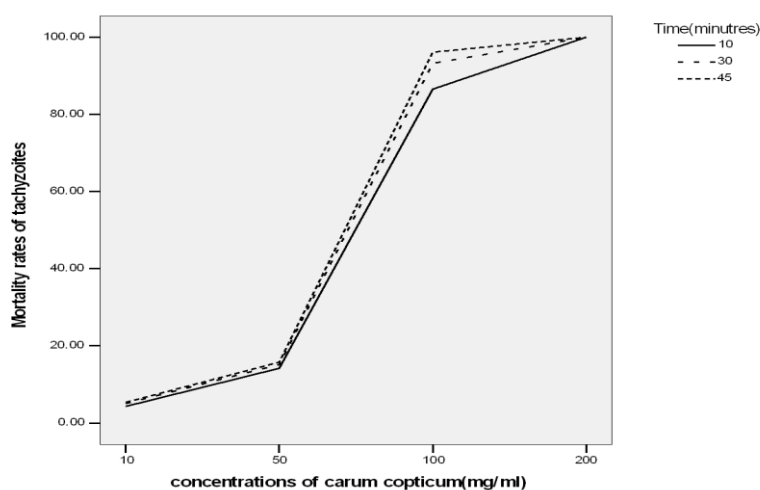
شکل ۱. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم / میلی لیتر عصاره افسنتین در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره زنیان: عصاره زنیان در غلظت های مختلف دارای اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها بود. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت های مختلف زنیان در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول ۲ و شکل ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. متوسط میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتا نولی گیاه زنیان در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	
۴/۳۰ ± ۱/۳۰	۱۴/۱۹ ± ۴/۰۳	۸۶/۵۳ ± ۳/۶۳	۱۰۰	۱۰
۵/۰۶ ± ۱/۴۴	۱۵/۱۵ ± ۲/۷۷	۹۳/۲۴ ± ۳/۱۶	۱۰۰	۳۰
۵/۳۵ ± ۲/۰۰	۱۵/۷۷ ± ۴/۰۴	۹۶/۱۱ ± ۱/۳۶	۱۰۰	۴۵

میزان کشندگی عصاره زنیان با افزایش غلظت، افزایش معنی دار نشان داد ($P<0.001$).
 میزان کشندگی هر یک از غلظت های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر به طور جداگانه
 در مدت زمان های مختلف انکوباسیون تفاوت معنی دار نشان نداد ولی در هر یک از مدت
 زمان های انکوباسیون، درصد مورتالیتی با افزایش غلظت افزایش معنی دار نشان داد
 ($P<0.001$).



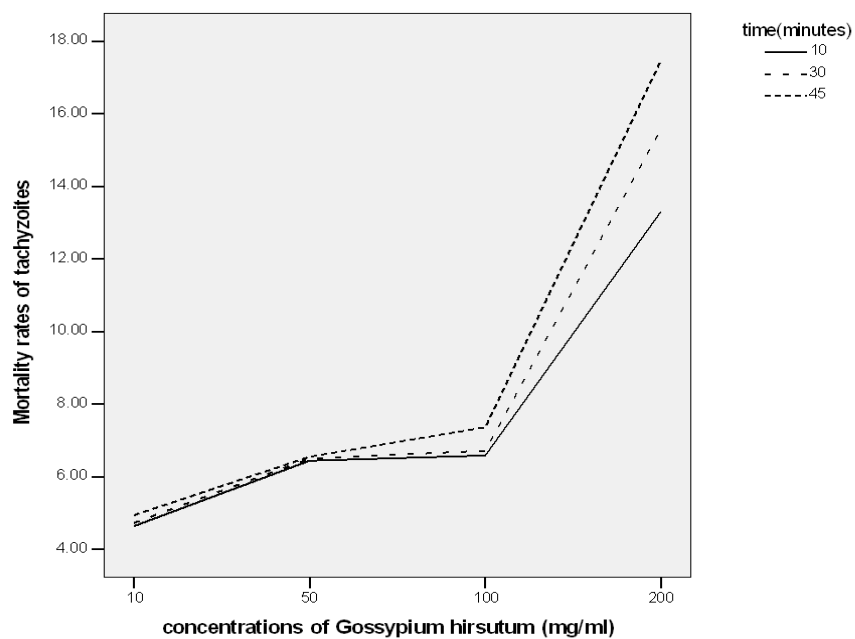
شکل ۲. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم / میلی لیتر عصاره زنیان در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره غوزه پنبه: عصاره غوزه پنبه در تمامی غلظت ها دارای اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها بود. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت های مختلف غوزه پنبه در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول ۳ و شکل ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳. متوسط میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه غوزه پنبه در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	
$4/63 \pm 1/21$	$6/44 \pm 1/44$	$6/58 \pm 1/75$	$13/30 \pm 4/12$	۱۰
$4/72 \pm 1/31$	$6/49 \pm 2/06$	$6/71 \pm 0/71$	$15/59 \pm 5/65$	۳۰
$4/93 \pm 0/99$	$6/55 \pm 1/83$	$7/36 \pm 1/44$	$17/47 \pm 2/99$	۴۵

میزان کشندگی با غلظت ثابت عصاره در مدت زمان های مختلف تفاوت معنی دار نشان نداد ولی با مدت زمان ثابت انکوباسیون در غلظت های مختلف درصد کشندگی تفاوت معنی دار نشان داد ($P < 0.001$)



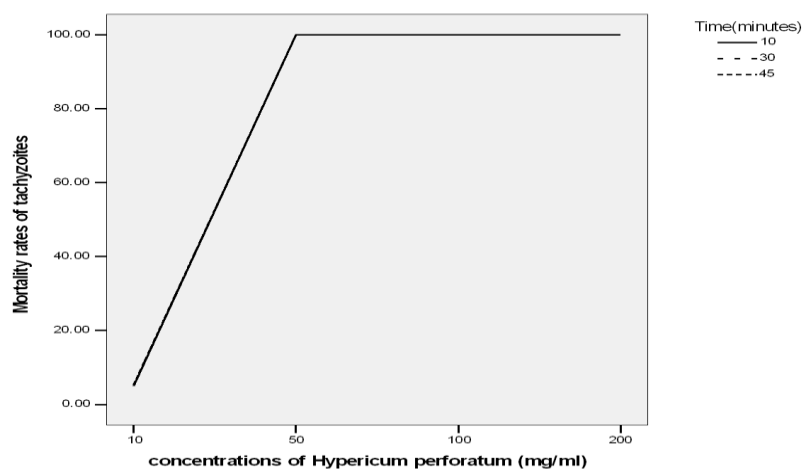
شکل ۳: میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم / میلی لیتر عصاره غوزه پنبه در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره چای کوهی: میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت مختلف چای کوهی در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول ۴ و شکل ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴. متوسط میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه چای کوهی در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	
۵/۰۱±۱/۰۹	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰
۵/۲۲±۰/۷۷	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۳۰
۵/۳۱±۰/۸۹	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۴۵

میزان کشندگی در غلظت ۱۰ میلی گرم / میلی لیتر به طور معنی دار از سایر غلظت ها کمتر بود ولی در این غلظت بین مدت زمان های مختلف انکوباسیون تفاوت معنی دار وجود نداشت.



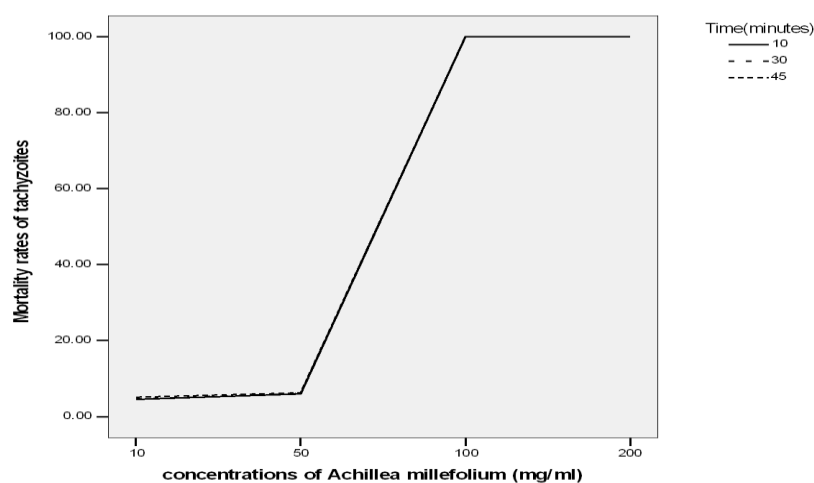
شکل ۴. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم / میلی لیتر عصاره چای کوهی در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره بومادران: میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت مختلف بومادران در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول ۵ و شکل ۵ نشان داده شده است.

جدول ۵. متوسط میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه بومادران در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	
۴/۵۳±۰/۹۱	۵/۰۹±۲/۴۳	۱۰۰	۱۰۰	۱۰
۴/۶۳±۰/۷۵	۶/۱۱±۲/۱۷	۱۰۰	۱۰۰	۳۰
۵/۱۱±۱/۱۲	۶/۲۶±۲/۷۰	۱۰۰	۱۰۰	۴۵

میزان کشندگی در غلظت های ۵۰ و ۱۰ با افزایش زمان انکوباسیون افزایش معنی داری را نشان داد ($P<0.05$) ولی بین غلظت های ۱۰ و ۵۰ در زمان های ثابت انکوباسیون تفاوت معنی داری وجود نداشت.



شکل ۵. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم / میلی لیتر عصاره بومادران در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه

جدول ۶. نتایج آزمون تعقیبی توکی در مقایسه چند گانه

عصاره	بومادران	چای کوهی	زنیان	غوزه پنبه
افسنطین	S	S	S	S
بومادران		NS	NS	NS
چای کوهی			NS	NS
زنیان				NS

S: sig($P<0.05$) , NS: no sig

نتایج زیست سنجی در موش:

عصاره هایی که در محیط عاری از سلول با تاکی زوئیت ها مجاورت داده شدند و به روش رنگ آمیزی ۱۰۰ درصد مرگ و میر داشتند به روش زیست سنجی در موش، مشاهده شد که تمامی موش های تلقیح شده تا یک ماه پس از تلقیح زنده ماندند.

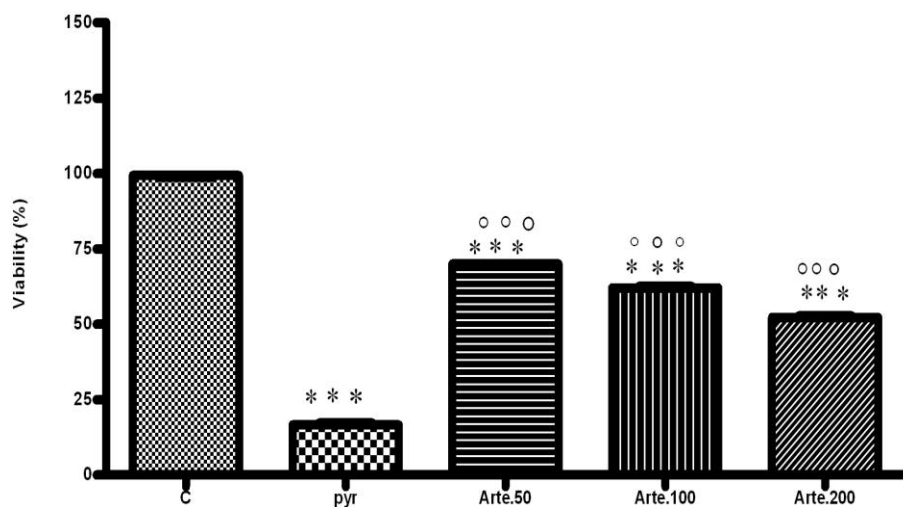
اثر مهاری عصاره های گیاهی بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما در کشت سلولی: هر سه عصاره افسنطین، بومادران و چای کوهی دارای اثر مهاری بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما در کشت سلولی بودند. EC_{50} و Selectivity هر یک از این عصاره ها بر تاکی زوئیت ها در جدول شماره ۷ و شکل های ۸-۶ نشان داده شده است.

جدول ۶. اثر مهاری عصاره های اتانولی گیاهان افسنطین، بومادران و چای کوهی بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای در

کشت سلولی HeLa

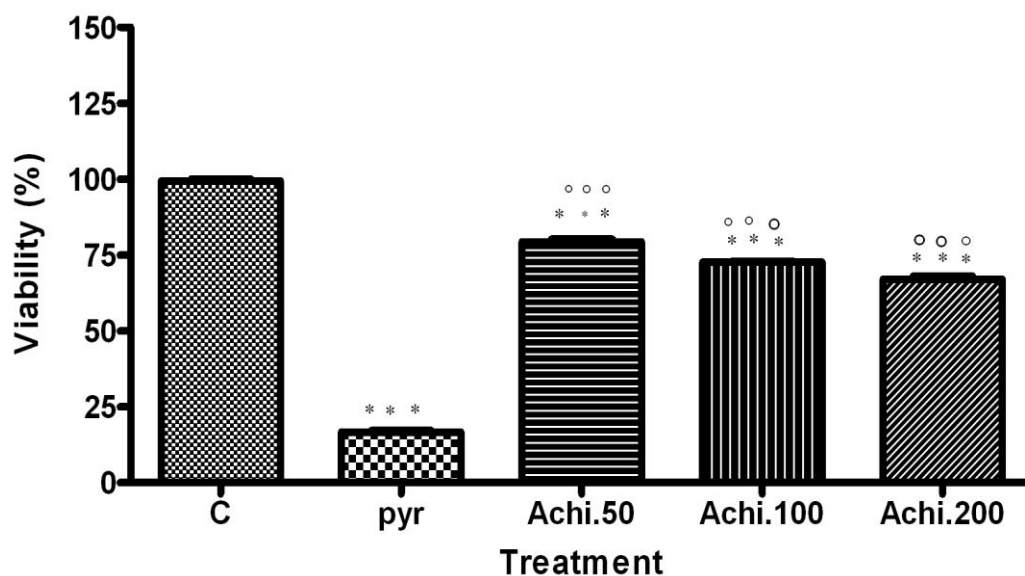
Herbal Extract/Drug	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		Selectivity ^a
	HeLa	HeLa + TOXO	
<i>Achillea millefolium</i>	158	215	0.73
<i>Hypericum perforatum</i>	105.9	153	0.69
<i>Artemisia absinthium</i>	120.8	159	0.75
Pyrimethamine	0.6	0.176	3.40

EC_{50} , median effective concentration; a= Ratio of the EC_{50} value for HeLa cells to the EC_{50} value for *T. gondii* RH strain.



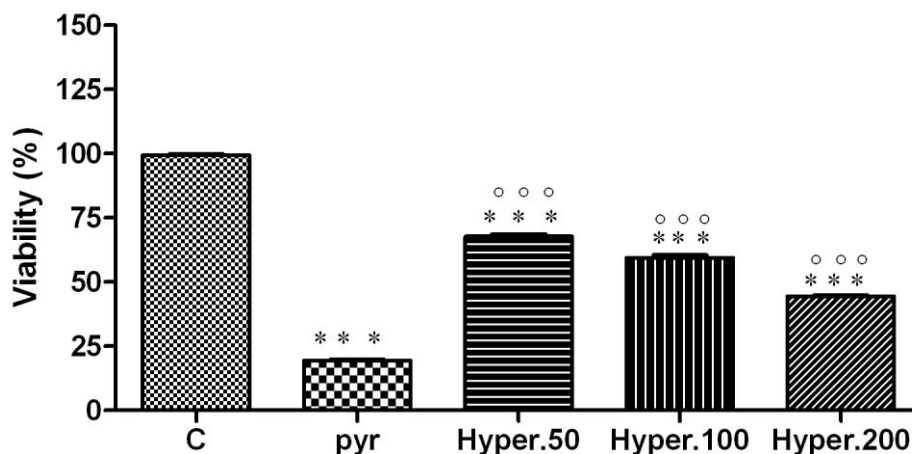
شکل ۶. مقایسه میزان ویابیلیتی تاکی زوئیت ها در کشت سلولی HeLa در غلظت های مختلف عصاره های افسنطین و داروی پیریمتامین در مقایسه با کنترل. C = کنترل (سلول هلا + تاکی زوئیت)؛ Pyr = پیریمتامین (1µg/ml)؛ Arte = افسنطین در غلظت های 50, 100, 200 µg/ml. *** $P < 0.001$ ، مقایسه گروه ها با کنترل، $P < 0.001^{ooo}$ ، مقایسه میان غلظت های مختلف عصاره افسنطین با داروی پیریمتامین.

همانطور که در شکل ۶ نشان داده شده است، عصاره بومادران به صورت وابسته به دوز در غلظت های ۵۰-۲۰۰ میکروگرم ویابیلیتی سلول هلا آلوده به تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل (سلول هلا+تاکی زوئیت) به صورت معنی دار کاهش داد ($P < 0.001$). همچنین پیریمتامین ویابیلیتی سلول هلا به همراه تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار کاهش داد ($P < 0.001$).



شکل ۷. مقایسه میزان ویابیلیتی غلظت های مختلف عصاره های بومادران و داروی پیریمتامین در سلول های هلا آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلازما در مقایسه با کنترل. C = کنترل (سلول هلا + تاکی زوئیت) ؛ Pyr = پیریمتامین (۱ μg/ml) ؛ Achi = بومادران در غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ μg/ml؛ *** P<0.001، مقایسه گروه ها با کنترل، °°° P<0.001، مقایسه میان غلظت های مختلف عصاره بومادران با داروی پیریمتامین

همانطور که در شکل ۷ نشان داده شده است، عصاره بومادران به صورت وابسته به دوز در غلظت های ۲۰۰-۵۰ میکروگرم ویابیلیتی سلول هلا آلوده به تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل (سلول هلا+تاکی زوئیت) به صورت معنی دار کاهش داد ($P<0.001$). همچنین پیریمتامین ویابیلیتی سلول هلا به همراه تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار کاهش داد ($P<0.001$).



شکل ۸. مقایسه میزان ویابیلیتی غلظت های مختلف عصاره چای کوهی و داروی پیریمتامین در سلول های هلا آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلازما در مقایسه با کنترل C. = کنترل (سلول هلا + تاکی زوئیت) ؛ Pyr = پیریمتامین (۱ μg/ml) ؛ Hyper = چای کوهی در غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ μg/ml؛ $P < 0.001^{***}$ ، مقایسه گروه ها با کنترل، $P < 0.001^{ooo}$ ، مقایسه میان غلظت های مختلف عصاره چای کوهی با داروی پیریمتامین

همانطور که در شکل ۸ نشان داده شده است، عصاره چای کوهی به صورت وابسته به دوز در غلظت های ۲۰۰-۵۰ میکروگرم ویابیلیتی سلول هلا آلوده به تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل (سلول هلا+تاکی زوئیت) به صورت معنی دار کاهش داد ($P < 0.001$). همچنین پیریمتامین ویابیلیتی سلول هلا به همراه تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار کاهش داد ($P < 0.001$).

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر هر پنج عصاره افسنطین، زنیان و غوزه پنبه چای کوهی و زنیان بر تاکی
 زوئیت های توکسوپلازما اثر کشندگی داشتند، منتهی اثر کشندگی عصاره های افسنطین و
 چای کوهی بیشتر از بقیه و زنیان اثر کشندگی نسبتاً خوبی و اثر کشندگی همه اینها به طور
 قابل توجهی بیشتر از غوزه پنبه بود. در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است که انواع عصاره
 های گیاهی با درجات مختلف دارای اثرات مهاری یا کشندگی بر تاکی زوئیت های
 توکسوپلازما می باشند. به طوری که در مطالعه Youn و همکاران (۲۰۰۳) فعالیت ضد
 توکسوپلازمایی ۵ عصاره الکلی گیاهی شامل، *Sophora flavescens* (گونه ای از تلخ
 بیان)، *Pulsatilla koreana* (گونه ای از بادلرزان)، *Torilis japonica* (گونه ای از
 هویج)، *Ulmus macrocarpa* (گونه ای از نارون) و *Sinomenium acutum* بر تاکی
 زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای و ئوسپورا کانینوم در مقایسه با سولفادیازین در محیط
 کشت سلولی ارزیابی شد که عصاره های *T. Japonica* و *S. flavescence* مهار کننده
 های بهتری برای هر دو انگل بودند (52). در مطالعه Jones-Brando و همکاران (۲۰۰۶)
 چهار تا از مشتقات جدید آرتیمی سینین درمنه (*Artemisinin*) اثر مهاری بر توکسوپلازما
 داشتند و اثر مهاری یکی از مشتقات حداقل دو برابر کمتر از بقیه بود (53). در مطالعه Choi
 و همکاران (۲۰۰۸)، ۲ تا از ۱۵ عصاره متانولی مورد مطالعه شامل عصاره های زنجبیل
 (*Zingiber officinale*) و تلخ بیان (*Sophora flavescens* Aiton) فعالیت ضد
 توکسوپلازمایی قوی نشان دادند (55).

در مطالعه Jiang و همکاران (۲۰۰۸)، اولئورپین (Oleuropein) جدا شده از گیاه زبان گنجشک (*Fraxinus rhychophylla*) اثر ضد توکسو پلاسما خوبی در *in vitro* نشان داد. به طوری که selectivity اولئورپین (۸/۹) به مراتب از سولفادیازین (۳/۸) و پریمتامین (۲/۵) بیشتر بود (56). در مطالعه Kavitha و همکاران (۲۰۱۲) ۲ تا ۴ فراکشن عصاره ریشه گیاه *Eurycoma longifolia jack* اثر ضد توکسو پلاسمایی قویتری داشتند (59).

اثرات آنتی بیوتیکی عصاره های گیاهی مربوط به ترکیبات موثره ای است که در آنها وجود دارد. به طور مثال ترکیبات اصلی انواع *Artemisia* شامل ترپنوئید ها، فلاونوئید ها، کومارین ها، کافئولکواینیک اسید و استرول ها است و به عنوان یک منبع مهم ترکیبات بیولوژیک در تهیه حشره کش ها، داروی ضد مالاریا، قارچ کش ها و ضد باکتری ها استفاده می شود. آرتیمی سینین (*Artemisinin*) که یک داروی بسیار موثر ضد مالاریاست منشاء گیاهی دارد و از گونه *A. annua* بدست آمده است (۶۲).

Kiderlen و همکاران در تحقیقی به نقش بره موم در کشتن آماسیگوت های لشمائیا دونوانی از طریق آزاد شدن اسید نیتریک و فاکتور نکروز دهنده تومور از ماکروفاژ ها در *In-vitro* اشاره کرده اند (۶۳). بالاتر بودن اثر کشندگی عصاره های افسنطین و زنیان نسبت به غوزه پنبه احتمالاً مربوط به تفاوت ترکیبات اصلی این عصاره هاست. مطالعاتی که در زمینه شناسایی ترکیبات اصلی این گیاهان در ایران انجام شده، نشان دهنده این تفاوت هاست. به طوری که در مطالعه قاسمی و همکاران ترکیبات اصلی اسانس میوه خشک زنیان (C. *copticum* L)، شامل تیمول (۳۶/۷٪)، γ -ترپن (۳۶/۵٪) و ρ -سیمن (۲۱/۱٪) بود و این

اسانس فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی در مقابل ۴ باکتری استاندارد سالمونلا تیفی موریوم، سودوموناس آئروژنوزا، اشرشیا کلی انتروپاتوژنیک و استافیلوکوکوس نشان داد (۶۴). در مطالعه کاظمی اسکویی و همکاران، ترکیبات عمده اسانس میوه خشک این گیاه شامل تیمول (۷۲/۳٪)، ترپانولین (۱۳/۱۲٪) و O-سیمن (۱۱/۹۷٪) بود که در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سابتلیس اثر ضد باکتریال شدیدی بروز دادند (۲۹). ترکیبات اصلی اسانس اجزای هوایی گیاه *Artemisia absinthium* جمع آوری شده از ارتفاعات البرز گیلان شامل منوترپن ها، بتا- پاینن و بتا-توجون بود (۶۵).

در مطالعه مروری سعید نیا و همکاران در سال ۲۰۱۱ به خواص ضد باکتری، قارچی و انگلی گیاه بومادران اشاره شده و بیان شده است که این اثرات ممکن است به دلیل وجود ترکیبات فلاونوئید ها *flavonoids*، اسید فنولیک *phenolic acid*، کومارین ها *coumarins*، ترپنوئید ها *terpenoids* (*mono*, *sesquiterpenes*, *diterpenes*, *triterpens*) و استرول های موجود در آن باشد (۶۶).

Sforcin و همکاران مطالعه ای بر روی تأثیر محلول هیدروالکلی بره موم بر فعالیت ها *Killer cell* انجام داد و مشاهده کرد این ماده فعالیت سیتوتوکسیک سلول های قاتل را افزایش داده و می تواند باعث افزایش فعالیت ضد باکتریایی و ضد پروتوزوئری بدن گردد (۶۷). *Hunter* در تحقیقی مشابه افزایش فعالیت سلو لهای سیتوتوکسیک علیه توکسوپلازما گوندی را نشان داد. بر اساس مطالعات فضلی بزاز و همکاران مشخص شد که عصاره باریجه، (*Ferula gummos*) دارای فعالیت ضد تک یاخته ای می باشد که ممکن است به

علت وجود ترکیب گالبالیک اسید Galbanic acid موجود در آن باشد (۶۸). در مطالعه Giorgio و همکاران به خواص ضد لیشمانیایی چای کوهی اشاره شده است که بدلیل وجود ترکیبات آنتی اکسیدان در آن می باشد (۶۹). Sandri و همکاران ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزاء غالب موجود در اسانس ها را با فعالیت ضد باکتریایی آنها گزارش نموده اند وجود مقادیر زیاد ۱،۸ Camphene، cineole و α -pinene، β -Pinene، Camphor، با خاصیت ضد باکتریایی این اسانس مرتبط است، شواهدی وجود دارد که نشان می دهند اسانس ها اثرات ضد باکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می کنند (۷۰). اولته و همکاران اظهار نمودند که گروه هیدروکسیل موجود در ملکول اجزای اسانس مانند کارواکرول، تیمول، سایمن متول برای بروز خاصیت ضد باکتریایی آنها بسیار مهم است (۷۱).

در مطالعه حاضر برای تایید ۱۰۰٪ اثر کشندگی عصاره ها بر تاکی زوئیت های سوئه RH توکسوپلازما از روش زیست سنجی در موش استفاده شد. به طور معمول اثر کشندگی عصاره ها و یا داروها بر تاکی زوئیت ها از طریق رنگ آمیزی با رنگ تریپان بلو و یا متیلن بلو انجام می شود که با رنگ آمیزی اولی تاکی زوئیت های مرده و با دومی تاکی زوئیت های زنده رنگ گرفته و مورد ارزیابی قرار گرفتند (۹ و ۱۵) ولی مطالعات تکمیلی به منظور شناسایی مولکول های موثر و مکانیسم عمل آنها به منظور دستیابی به یک داروی جدید ضد توکسوپلازما نیاز است.

یکی از کاربردهای احتمالی عصاره های گیاهان دارویی با اثر ضد توکسوپلاسمایی، استفاده از آنها در پیشگیری از توکسوپلاسموز مادرزادی و فعال شدن مجدد توکسوپلاسمای بیماران با اختلال یا تضعیف ایمنی است. جنین مادران سرونکاتیو توکسوپلاسمای مبتلایان به ایدز و افراد تحت درمان داروهای سرکوب کننده ایمنی گروه های در معرض خطر بالای توکسوپلاسموز می باشند. پیشگیری از توکسوپلاسموز در این افراد بسیار اهمیت دارد. در حال حاضر از داروهای سنتتیک برای این منظور استفاده می شود که عوارض جانبی مهمترین عامل محدود کننده استفاده از این داروهاست. به نظر می رسد که فراورده های گیاهی با اثر ضد توکسوپلاسمایی می توانند جایگزین مناسب داروهای سنتتیک برای پیشگیری از توکسوپلاسموز در این افراد باشد. مطالعه خوشزبان و همکاران نشان داد که تجویز خوراکی عصاره سیر سبب افزایش بقاء موش های BALB/c تلقیح شده با سویه RH و کاهش فراوانی انگل در بافت های آنها شد (۲۳). مطالعات پیشگیری کننده توکسوپلاسموز با استفاده از فراکشن های عصاره های با اثرات ضد توکسوپلاسمایی می تواند روشن کننده این نقش احتمالی عصاره های گیاهی باشد.

نتیجه گیری:

از مطالعه حاضر نتیجه گیری می شود که هر پنج عصاره اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها توکسو پلازما گوندی ای داشتند. این اثر برای چای کوهی و افسنطین و بومادران از زنیان و غوزه پنبه بیشتر بود. اثر ضد توکسوپلازمایی عصاره ها وابسته به دوز بود تا وابسته به مدت زمان انکوباسیون. همچنین اثر بخشی عصاره گیاهان مورد مطالعه در مقایسه با داروی پیریمتامین به مراتب کمتر بود.

پیشنهادهات:

۱. مطالعات تکمیلی با استفاده از فراکشن عصاره های چای کوهی، افسنطین و بو مادران که دارای اثر بخشی بیشتری بودند، انجام گیرد.
۲. مطالعات *In vivo* اثر بخشی عصاره های چای کوهی، افسنطین و بومادران با استفاده از سویه های ویرولان و غیر ویرولان توکسوپلازما انجام گیرد.

References

1. Montoya JG, Boothroyd JC, Kovacs JA. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010. 3495-526.
2. John C. Boothroyd. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. Int Journal Parasito, 2009; 39(8): 935–46.
3. Larry S. Roberts, John Janovy, Jr. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology. McGraw-Hill Companies, Inc, New York, 2009, 43-60.
4. Dubey J P , Lindsay D S, Speer C A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. Clinical microbiology reviews, 1998; 11(2): 267–99.
5. Hill, D. and J. Dubey, *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clinical microbiology and infection, 2002; 8(10): 634-40.
6. Chinchilla M, Ruiz A. Cockroaches as possible transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. J Parasitol. 1976; 62(1): 140-2.
7. Agmas B, Tesfaye R, Koye DN. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors among pregnant women in Debre Tabor, Northwest Ethiopia BMC Res Notes. 2015; 8: 107.
8. Gyang VP, Akinwale OP, Lee YL, Chuang TW, Orok A, Ajibaye O, Liao CW, Cheng PC, Chou CM, Huang YC, Fan KH, Fan CK. *Toxoplasma gondii* infection: seroprevalence and associated risk factors among primary

schoolchildren in Lagos City, Southern Nigeria. RevSoc Bras Med Trop. 2015; 48(1): 56-63.

9. Aynioglu A, Aynioglu O, Altunok ES. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* rubella and Cytomegalovirus among pregnant females in north-western Turkey. Acta Clin Belg. 2015 Apr 29;2295333715Y0000000021.

10. Shen Q, Wang L, Fang Q, Shen JL, Zhang LJ. Seroprevalance of *Toxoplasma gondii* infection and genotyping of the isolates from cancer patients in Anhui, eastern China. 2014; 32(5): 366-70.

11. Cong W, Dong W, Bai L, Wang XY, Ni XT, Qian AD, Zhu XQ. Seroprevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in psychiatric patients: a case-control study in eastern China. Epidemiol Infect. 2015; 17: 1-7.

12. Meng QF, You HL, Zhou N, Dong W, Wang WL, Wang WL, Cong W. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and associated risk factors among children in Shandong and Jilin provinces, China . Int J Infect Dis. 2015; 30: 33-5.

13. Abu EK, Boampong JN, Ayi I, Gharthey-Kwansah G, Afoakwah R, Nsiah P, Blay E. Infection risk factors associated with seropositivity for *Toxoplasma gondii* in a population-based study in the Central Region, Ghana. Epidemiol Infect. 2014; 6: 1-9.

14. Siddiqui N, Shujatullah F, Khan HM, Rabbani T, Khan PA. IgG avidity antibodies against *Toxoplasma gondii* in high risk females of reproductive age group in India. Korean J Parasitol. 2014; 52(5): 487-91.

15. Anuradha B, Preethi C. Seroprevalence of *Toxoplasma* IgG Antibodies in HIV Positive Patients in and Around Khammam, Telangana State. J Clin Diagn Res. 2014 Sep; 8(9): DL01-2. doi: 10.7860/JCDR/2014/9211.4880. Epub 2014 Sep 20.

16. Mahmoudvand H, Saedi Dezaki E, Soleimani S, Baneshi MR, Kheirandish F, Ezatpour B, Zia-Ali N. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among healthy blood donors in southeast of Iran. Parasite Immunol. 2015 Apr 17. doi: 10.1111/pim.12198. [Epub ahead of print]

17. Saki J, Mohammadpour N, Moramezi F, Khademvatan S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in women who have aborted in comparison with the women with normal delivery in Ahvaz, southwest of Iran. ScientificWorldJournal. 2015.

18. Yad Yad MJ, Jomehzadeh N, JafarSameri M, Noorshahi N. Seroprevalence of *Anti-Toxoplasma gondii* Antibodies Among Pregnant Woman in South Khuzestan, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2014; 7(5): e9998. doi: 10.5812/jjm.9998. Epub 2014 May 1.

19. Hajsoleimani F1, Ataeian A, Nourian A, Mazloomzadeh S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Pregnant Women and Bioassay of IgM Positive Cases in Zanjan, Northwest of Iran. Iran J Parasitol. 2012; 7(2): 82-6.

20. Hashemi HJ, Saraei M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in unmarried women in Qazvin, Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J. 2010 Jan; 16(1): 24-8.

۲۱. صفار م ج، عجمی ا، مسلمی زاده ن. بررسی شیوع آلودگی توکسوپلازما گوندی در خانم های باردار شهرستان ساری. مجله علمی پژوهشی دانشگاه مازندران، ۱۳۷۸ شماره ۲۴، ۵-۱.

22. Fallah E, Rasuli A, Shahbazi A, Ghojzadeh M, Khanmohammadi M, Hamzavi F, Roshanaei R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection among High School Girls in Ajabshir from East Azarbaijan Province, Iran. J Caring Sci. 2014; 1; 3(3): 205-10.

23. Sarkari B, Shafiei R, Zare M, Sohrabpour S, Kasraian L. Seroprevalence and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection among blood donors in southern Iran. J Infect Dev Ctries. 2014; 15; 8(4): 543-7.

24. Jafari R, Sadaghian M, Safari M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection and Related Risk Factors in Tabriz City, Iran, 2008. J Res Health Sci. 2012; 13; 12(2): 119-21.

25. Pfefferkorn E R, Nothnagel R F, Borotz S E. Parasitocidal effect of clindamycin on *Toxoplasma gondii* grown in cultured cells and selection of a drug-resistant mutant. Antimicrob. Agents Chemother. 1992; 36(5): 1091-1096.

26. Chang HR, Pechère JC. In vitro effects of four macrolides (roxithromycin, spiramycin, azithromycin [CP-62,993], and A-56268) on *Toxoplasma gondii*. Antimicrob Agents Chemother. 1988; 32(4): 524-9.

۲۷. زرگری ع. گیاهان دارویی، جلد دوم، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۰، شماره انتشار ۱/۱۸۱۰ صفحات ۵-۹.

۲۸. صمصام شریعت ه. تجزیه و شناسایی مواد دارویی گیاهی به روش میکروسکوپی و کروماتوگرافی. چاپخانه فرهنگ معاصر. چاپ اول، ۱۳۸۲.

۲۹. خلیلی دهکردی ب، رفیعیان م، حجازی ح، یوسفی ح، یکتائیان ن، شیرانی بیدابادی ل. بررسی تاثیر عصاره های گیاهی افسنطین، بومادران و برگ گردو بر انگل تریکوموناس واژینالیس در محیط کشت آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد. شماره ۴. بهمن ۱۳۸۹: ۶۹-۶۲.

۳۰. ربیعی م، جلیلی ع، سفید کن ف. بررسی ترکیبات شیمیایی ایانی ۴ گونه *Artemisia* در شمال ایران. مجله پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی. شماره ۶۱. زمستان ۱۳۸۱: ۶۳-۵۷.

۳۱. یکتائیان ن، رفیعیان م، خلیلی دهکردی ب، حجازی سید ح، شیرانی بیدآبادی ل، حسینی سید ع. بررسی اثرات سینرژیستی مخلوط سه عصاره گیاهی بومادران افسنطین و برگ گردو بر انگل لیثمانیا ماژور *MRH/ IR/ 75 ER* در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه گیاهان دارویی. شماره ۲۲. بهار ۱۳۹۰: ۲۰۴-۱۹۷.

۳۲. تک زارع ن، مرتضوی سید ح، حسن زاده غ، صفایی س، حسینی میر ج. تاثیر عصاره الکلی گیاه بومادران در روند اسپرماتوژنز در رت. مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، جلد ۷۰. شماره ۱۱. بهمن ۱۳۷۹: ۶۹۰-۶۸۴.

۳۳. زاهدی خراسانی م، طاهریان ع، وفایی ع، رجبی م ر، رشیدی پور ع. ارزیابی اثر عصاره هیدروالکلی سر شاخه های گیاه بومادران *Achillea Millefolium* بر تعدیل اضطراب در موش کوچک آزمایشگاهی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان. جلد ۷. شماره ۳. تابستان ۱۳۸۵: ۱۷۶-۱۷۱.

۳۳. دانایی ق. "پنبه ایران و مصارف داروئی و صنعتی آن". پایان نامه دکتری داروسازی، دانشکده پزشکی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. شماره ۳۱۶. ۷۷-۱۳۷۶.

۳۴. جعفرزاده ل، عسگری ا، گلشن ایرانپور ف، خیری س، پروین ن، رفیعیان م. بررسی تاثیر چای کوهی در ایجاد سقط در موش های سوری. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ویژه نامه طب تکمیلی. شماره ۴ زمستان ۱۳۸۸: ۳۱-۲۶.

۳۵. اصغری زکریا ر، زارع ن. بررسی کروموزومی گونه های چای کوهی در رویشگاه های شمال غرب ایران. فصلنامه علمی - پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان و مرتعی و جنگلی ایران. جلد ۲۱. شماره ۱. سال ۱۳۹۲: ۱۳۹-۱۳۲.

۳۶. مهربانی ب، ناظری س، پیری خ. بررسی میزان فنول کل در گیاه چای کوهی از طریق کشت کالوس و امکان افزایش آن با استفاده از محرک ها. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. دوره ۴. شماره ۲. بهار ۱۳۹۲: ۷۷-۸۸.

۳۷. احمدی نیا ا، سفید کن ف، قلاوند ا، طهماسبی سروستانی ز، شریفی آشوب آبادی ا. ترکیب های شیمیایی اسانس گیاه دارویی زنیان تولید شده در قزوین. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین. سال نهم. شماره ۳. پاییز ۱۳۸۴: ۲۲.

۳۸. شهابی س، ایازی روز بهانی ف، کمالی نژاد م، ابدی ع. بررسی اثر کشندگی عصاره و اسانس گیاه زنیان بر روی کیست ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی. مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی، دوره ۳۲. شماره ۴. زمستان ۱۳۸۷: ۳۰۷-۳۰۳.

۳۹. ناطق پور م، میاهی پور ا، ادریسیان غ، سوری ع، متولی حقی ا. تاثیر عصاره الکلی گیاه گلدر بر پلاسمودیوم برگئی در موش سفید آزمایشگاهی (سوری) و مقایسه آن با اثر کلروکین. مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران. شماره ۱. بهار ۱۳۸۷: ۶۲-۵۷.

۴۰. براتی م، شریفی ا، شریفی فر ف. بررسی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره های آویشن شیرازی، اسپند و مورد با روش رنگ سنجی به صورت برون تنی (in vitro) . مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. شماره ۱. سال ۱۳۸۸: ۳۲-۴۱.

۴۱. براتی م، شریفی ا، شریفی فر ف. بررسی تاثیر ضد لیشمانیایی عصاره های درمنه کوهی، آنغوره و غوزه پنبه بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران شماره ۳. پاییز ۱۳۸۹: ۱۶۶-۱۷۲.

۴۲. سرشتی م، یوسفی دارانی ح، زبردست ن، رفیعیان م، منوچهری نائینی ک، یوسفی ح. تأثیر عصاره آبی و اتانولی سرشاخه های هوایی گیاه چای کوهی بر تریکوموناس واژینالیس در محیط کشت. فصلنامه گیاهان دارویی. شماره ۸ زمستان ۱۳۹۰: ۱۵۹-۱۶۵.

۴۳. محرابی م، صدراپی ج، غفاری فر ف. بررسی مقایسه ای تاثیر قرص سیر و عصاره الکلی ذغال اخته بر روی اووسیست کریپتوسپوریدیوم پارووم در محیط HANK مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان. دوره ۱۷. شماره ۲. تابستان ۱۳۹۱: ۵۳-۶۰.

44. Sozangar N, Jeddi F, Reaghi S, Khorrami S, Arzamani K. Abulkhalsa and Yarrow plant effect on Leishmania major in vitro. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences Autumn 2012; 4(3): 334.

45. Unlu M, Ergene E, Unlu GV, Zeytinoglu HS, Vural N. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from Cinnamomum zeylanicum Blume (Lauraceae). Food Chem Toxicol. 2010; 48(11): 3274-80. doi: 10.1016/j.fct.2010.09.001.

۴۶. عطایی ز، انصاری موسوی ا، میرزایی ا. مطالعه آزمایشگاهی اثر ضد قارچ عصاره های افسنتین، اکالیپتوس، پیاز، دارچین، زردچوبه، مریم گلی، نعناع و همیشه بهار بر سوش استاندارد کاندیدا آلبیکانس در مقایسه با دهان شویه نیستاتین. مجله دندان پزشکی جامعه اسلامی دندانپزشکان. دوره ۱۹. شماره ۲، تابستان ۱۳۸۶: ۹۷-۹۱.

۴۷. زهره جعفری ز، مجد ا، مهرابیان ص. بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره بخشهای مختلف گیاه گزنه دوپایه. همایش ملی فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی. بجنورد، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، ۵ لغایت ۶ مهرماه ۱۳۹۳.

48. Astulla A, Zaima K, Matsuno Y, Hirasawa Y, Ekasari W, Widyawaruyanti A, Cholies Zaini N, Morita H. Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. Journal of Natural Medicines. J Nat Med. 2008 Oct; 62(4):470-2. doi: 10.1007/s11418-008-0259-7.

49. Patrícia S L, Tatiana S T, Luis G M, Paloma K M. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2005; 41(1); 85-94.

50. Tariku Y, Hymete A, Hailu A, Rohloff J. In vitro evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of *Artemisia absinthium* and *echinops kebericho*. Chemistry & Biodiversity Chem Biodivers. Chem Biodivers. 2011 Apr; 8(4): 614-23. doi: 10.1002/cbdv.201000331.

۵۱. خوش زبان ف، غضنفری ط، غفاری فرف، شرفی م، قاسمی نیکو س. بررسی اثر سیر بر توکسوپلاسموزیس حاد در مدل موشی. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۳. شماره ۳. تیر ۱۳۸۶؛ ۳۰۶-۲۹۵.

52. Youn H.J, Lakritz b, Kimc D.Y, Rottinghaus b, Marsh b. Anti-protozoal efficacy of medicinal herb extracts against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. H.J. Youn et al. *Veterinary Parasitology*. 2003; 116(1); 7–14.
53. Jones-Brand L, D’angel J, Posner G, Yolken R. In Vitro Inhibition of *Toxoplasma gondii* By Four New Derivatives of Artemisinin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50(12): 4206-8.
54. Najia A, Al-Zanbagi. Effectiveness of Myrrh and Spiramycin as Inhibitors for *Toxoplasma gondii* Tachyzoites in Vivo. *Mansoura J. Forensic Med. Clin. Toxicol*. 2007; 2; 117-127.
55. Choi W, Jiang M, Chu J. Antiparasitic Effects of *Zingiber Officinale* (Ginger) Extract against *Toxoplasma gondii*. *Journal of Applied Biomedicine*. 2013; 11(1): 15-26. doi: 10.2478/v10136-012-0014-y.
56. Jiang j, JIN c-m, KIM y, KIM h, park W, park H. Anti-toxoplasmosis Effects of Oleuropein Isolated from *Fraxinus rhychophylla* *Biol. Pharm. Bull. Biol Pharm Bull*. 2008; 31(12): 2273-6.
57. Chen SX1, Wu L, Jiang XG, Feng YY, Cao JP. Anti-*Toxoplasma gondii* activity of GAS in vitro. *J Ethnopharmacol*. 2008; 118(3): 503-7. doi: 10.1016/j.jep.2008.05.023.
58. de Oliveira TC, Silva DA, Rostkowska C, Béla SR, Ferro EA, Magalhães PM, Mineo JR. *Toxoplasma gondii*: effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models in vitro and in vivo. *Exp Parasitol*. 2009; 122(3): 233-41. doi: 10.1016/j.exppara.2009.04.010.
59. Kavitha N1, Noordin R, Chan KL, Sasidharan S In vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity of root extract/fractions of *Eurycoma longifolia* Jack. *BMC Complement Altern Med*. 2012 Jul 10; 12:91. doi: 10.1186/1472-6882-12-91.

60. <http://www.darooyab.ir/HerbalDrug.aspx>
61. Gillespie S.H, Hawkey P.M. Medical Parasitology A Practical Approach. New York: Oxford University Press Inc. 1995.
- 62 Bora KS1, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. Pharm Biol. 2011 Jan; 49(1): 101-9. doi: 10.3109/13880209.2010.497815.
63. Kiderlen AF1, Kayser O, Ferreira D, Kolodziej H. killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor alpha in macrophages in vitro. Z Naturforsch C. 2001; 56(5-6): 444-54.
- 64.Ghasemi Pirbalouti A, Firoznezhad M, Craker L, et al. Essential oil compositions, antibacterial and antioxidant activities of various populations of *Artemisia chamaemelifolia* at two phenological stages. Rev Bras Farmacogn. 2013; 23(6): 861-869. doi:10.1590/S0102-695X2013000600002.
- 65.Kazemi Oskuee R, Behravan J, Ramezani M. Chemical composition, antimicrobial activity and antiviral activity of essential oil of *Carum copticum* from Iran. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2011; 1(2): 83-90.
66. Saeidnia s, Gohari AR, Mokhaber- dezfuli N. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. Daru. 2011; 19(3): 173-86.
- 67.Sforcin JM, Kaneno R, Funari SRC. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. J Venom Anim Toxins. 2002; 8: 19-29.
68. Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS. Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of

interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol*. 1995; 25(4): 994-1000.

69. Di Giorgio C, Delmas F, Tueni M, Cheble E, Khalil T, Balansard G. Alternative and complementary antileishmanial treatments: assessment of the antileishmanial activity of 27 Lebanese plants, including 11 endemic species. *J Altern Complement Med*. 2008 Mar; 14(2):157-62. doi: 10.1089/acm.2007.7041.

70. Sandri I. G., Zacaria J., Fracaro F., Delamare A. P. L., and Echeverrigaray S.. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Culina* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food chemistry*, 2007: 103: 823-828.

71. Ultee A1, Bennik MH, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(4): 1561-8.

Abstract

Background: Production of an anti-*Toxoplasma* drug with a high efficiency and also low side effects is one of the most important priorities in toxoplasmosis researches. Herbal products can be considered as a candidate for this purpose.

Objective: This study was performed in order to determine anti- *Toxoplasma* effects of *Artemisia absinthium*, *Achillea millefolium*, *Gossypium hirsutum*, *Carum copticum*, and *Hypericum perforatum* ethanolic extracts *in vitro*.

Materials and Methods: In first experience, the assay was performed by treatment of tachyzoites with different concentrations of the extracts (10, 50, 100 and 200 mg/ml) within 10, 30, and 45 min in room temperature. Afterward, the tachyzoites were stained with alkaline methylene blue. The results were expressed as mortality rate (%) of tachyzoites (unstained tachyzoites). The treated tachyzoites with extracts that showed 100% mortality, were bioassay in mice. In second experience, the tachyzoites were treated with concentrations of 50, 100 and 200 µg/ml of *Artemisia absinthium*, *Achillea millefolium*, and *Hypericum perforatum* ethanolic extracts in cell culture (HeLa cell). Pyrimethamine was used as control. Cytotoxicity effects of herbal extracts and pyrimethamine were determined by MTT assay and their EC₅₀ and selectivity were calculated. All of the treatments were assayed in triplicate. Statistical analysis of the data was performed using SPSS software (ver16.0) and ANOVA and Post Hoc Tests. EC₅₀ was calculated using prism software.

Result: overall, in first experience, at concentrations of 100 and 200 mg/ml of *A. millefolium*, *H. perforatum* and *A. absinthium* extract, 100% tachyzoites in each incubation time of 10, 30 and 45 min were killed. At concentration of 50 mg/ml of *H. perforatum* and *A. absinthium*, 100% tachyzoites were killed. Mortality rate of *Carum copticum* was between 100 and 4.65±2.1% (maximum and minimum mortality), respectively. The highest mortality rate for *Gossypium hirsutum* extract was 13.30±7.15%. In cell culture, EC₅₀ and selectivity were 215 and 0.73 for *Achillea millefolium*, 153 and 0.69 for *Hypericum perforatum*, 159 and 0.75 for *Artemisia absinthium*, respectively. Also, EC₅₀ and selectivity were 0.176 and 3.40 for pyrimethamine, respectively.

Conclusion: All of the herbal extracts have anti-Toxoplasma activities *in vitro* and it was significantly high for *A. millefolium*, *H. perforatum* and *A. absinthium* extracts in comparison with *Gossypium hirsutum* and *Carum copticum* extracts.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, herbal extract, *Achillea millefolium*, *Hypericum perforatum*, *Artemisia absinthium*, *Gossypium hirsutum*, *Carum copticum*, *in vitro*.